

Untersuchungen zur Desinfektion von
Chlamydophila pneumoniae und *Chlamydia trachomatis*
mit schleimhauttauglichen Desinfektionsmitteln

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Janosch Nicolas Burkhardt
geboren am 7. Dezember 1973 in Pforzheim

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Eberhard Straube
2. Prof. Dr. med. Jürgen Strobel
3. Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans-Günther Sonntag

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Jena, den 7. April 2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
2. Problemstellung.....	7
2.1 Aufbau eines leicht praktikablen Testverfahrens zur Quantifizierung der Wirkung von Desinfektionsmitteln auf Chlamydien in Mikrotiterplatten.	7
2.2 Wirkung von PVP-Iod-Verbindungen und Chlorhexidin auf die Stämme <i>C. pneumoniae</i> serovar <i>TW-183</i> und das klinische Isolat <i>HK</i> sowie <i>C. trachomatis</i> serovar <i>D</i>	7
2.3 Erarbeitung einer Empfehlung zur Testung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika gegen Chlamydien.	8
3. Theoretische Grundlagen	9
3.1 Chlamydien	9
3.2 Grundlagen der Desinfektion und der Desinfektionsmittel.....	16
4. Material und Methoden	24
4.1 Chlamydien	24
4.2 Desinfektionsmittel	25
4.3 Desinfektionsmittelreaktion	25
4.4 Beendigung der Desinfektionsmittelreaktion durch Verdünnung.....	29
4.5 Übertragung auf Zellen	31
4.6 Zentrifugation.....	32
4.7 Chlamydienkultur.....	33
4.8 Fixierung und Färbung	33
4.9 Mikroskopie	34
4.10 Berechnung und Auswertung	35
4.11 Versuchsdurchführung	36
5. Ergebnisse	38
5.1 PVP-Iod.....	39
5.2 Chlorhexidin.....	53
5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	59
6. Diskussion	65
7. Zusammenfassung.....	76
8. Anhang	77
8.1 PVP-Iod.....	77
8.2 Chlorhexidin.....	82
8.3 Zusammensetzung des verwendeten PBS	84
Literaturverzeichnis.....	85
Danksagung.....	99
Lebenslauf.....	100
Ehrenwörtliche Erklärung	101

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
BGA	Bundesgesundheitsamt
BGM	Buffalo Green Monkey
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
ELD ₅₀	Egg Lethal Doses 50%: Chlamydiendosis, die bei Beimpfung die Hälfte aller beimpften Hühnerembryonen abtötet.
EN	Europäische Norm
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
IFU	Inclusion forming unit
KBE	koloniebildende Einheiten
LCR	Ligase Chain Reaction
LPS	Lipopolysacharid
MIF	Mikroimmunfluoreszenz
MOMP	Major Outer Membrane Protein
PBS	Phosphate Buffered Solution
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RF	Reduktionsfaktor
TWAR	Bezeichnung entstanden aus dem ersten konjunktivalen (<i>TW-183</i>) und dem ersten respiratorischen Isolat (<i>AR-39</i>) von <i>C. pneumoniae</i> .
VL	Verdünnungslösung
VW ₁	Vorwert 1: Entspricht Kontrolle ohne Restdesinfektionsmittel
VW ₂	Vorwert 2: Entspricht Kontrolle mit Restdesinfektionsmittel

1. Einleitung

Ist die Überprüfung einer Desinfektionsmittelwirkung auf Bakterien normalerweise unproblematisch und durch einschlägige Vorschriften gut definiert, so stellt sich die Situation bei Chlamydien aufgrund ihres komplexen Vermehrungszyklus wesentlich komplizierter dar. Dies liegt im Wesentlichen daran, dass die intrazellulären Retikularkörperchen für die Desinfektionsmittel nicht erreichbar sind. Aus diesem Grund gibt es bis jetzt keine anerkannten Vorschriften für die Prüfung von Desinfektionsmitteln bei Chlamydien.

1976 erschien die erste Veröffentlichung einer Untersuchung über die Widerstandsfähigkeit von *C. trachomatis* gegenüber iodhaltigen Desinfektionsmitteln (Reeve, P., 1976). Bereits zwei Jahre später wurde erneut eine Arbeit über dieses Thema veröffentlicht (Thomas, B. J., 1978). 1984 und 1990 folgten weitere Artikel (Thomas, D., 1984; Benevento, W. J., 1990). In diesen Arbeiten wurden sehr unterschiedliche Methoden angewandt:

So wurde einerseits die Überlebenszeit von Hühnerembryonen nach Infektion mit den behandelten Chlamydien untersucht (Reeve P., 1976; Thomas, B. J., 1978). Das Ergebnis wurde in diesen Arbeiten als Verlängerung der Überlebenszeit in Abhängigkeit der Desinfektionsmittelverdünnung dargestellt.

Andererseits wurden die behandelten Elementarkörperchen auf McCoy-Zellen aufzentrifugiert und die sich ausbildenden Einschlusskörperchen gezählt (Thomas, D., 1984; Benevento, W. J., 1990).

Dabei kommen die einzelnen Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen, die durch die verschiedenen Methoden schlecht vergleichbar sind.

Verschafft man sich einen Überblick über die getestete Wirkung des Chlorhexidins auf Chlamydien, so macht man ebenso die Erfahrung, dass die Ergebnisse in den verschiedenen Arbeiten erheblich voneinander abweichen, obwohl als Nachweisverfahren in allen beschriebenen Fällen die Zellkultur verwendet wurde:

- 1975 wurde die Wirkung von Chlorhexidin gegenüber *C. trachomatis* serovar *E* ohne Eiweißbelastung getestet. Dabei wurde mit einer Konzentration von 0,00225% und einer Einwirkungszeit von 20 min eine Keimreduktion von 99,96% nachgewiesen (Richmond, S. J., 1975).
- 1979 wurde mit einer Konzentration von 0,001% ohne Eiweißbelastung bei der längsten der getesteten Einwirkungszeiten von 40 min eine Reduktion von *C. trachomatis* um 94% erreicht (Nisbet, I. T., 1979).

- 1984 wurde mit einer Chlorhexidinkonzentration von 0,02% ab 30 min Einwirkungszeit eine Reduktion von *C. trachomatis* um 100% erreicht (Thomas, D., 1984).
- 1995 erbrachte die Einwirkung von 0,04% während 15 min und von 0,004% während 60 min eine Reduktion von *C. trachomatis* um >99% (Lyons, J. M., 1995).
- 1998 wurde unmittelbar nach Einwirkungsbeginn mit 0,0625% und nach 120 min mit 0,0156% Chlorhexidin eine Reduktion von 100% von *C. trachomatis* serovar D nachgewiesen. Für *C. trachomatis* serovar F erbrachten die Chlorhexidinkonzentrationen 0,0313% unmittelbar nach Einwirkungsbeginn und 0,0078% nach 120 min eine Keimreduktion um 100% (Lampe, M. F., 1998).

Hieraus wird ersichtlich, dass auch in diesem Fall abweichende Ergebnisse vorliegen. Dies mag dadurch bedingt sein, dass bislang kein übereinstimmendes Messverfahren für die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf Chlamydien vorhanden ist.

Ferner ist bisher die Wirkung der Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* nicht untersucht worden, obwohl die therapeutische Anwendung von Schleimhautdesinfektionsmitteln gerade bei Infektionen des Nasen-Rachen-Raumes eine große Rolle spielt (Klingbeil, W., 1982) und *C. pneumoniae* als Verursacher dieser Erkrankungen nicht zu unterschätzen ist. In Studien wurde bei 18% aller Patienten mit Erkrankungen des oberen Nasen-Rachen-Raumes (Liebermann, D., 1998) und bei 8% aller Patienten mit Pneumonie (Tan, J. S., 1999) *C. pneumoniae* nachgewiesen.

Ziel dieser Arbeit soll sein:

- Aufbau eines leicht praktikablen Testverfahrens zur Quantifizierung von Desinfektionsmittelwirkungen auf Chlamydien in Mikrotiterplatten.
- Untersuchung der Wirkung von PVP-Iod-Verbindungen und Chlorhexidin auf die Stämme *C. pneumoniae* serovar TW-183 und das klinische Isolat HK sowie auf *C. trachomatis* serovar D.
- Erarbeitung einer Empfehlung zur Testung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika gegen Chlamydien. Dadurch soll eine bessere Vergleichbarkeit der Wirkung der Desinfektionsmittel und nach Möglichkeit eine Standardisierung des Testverfahrens erreicht werden.

2. Problemstellung

2.1 Aufbau eines leicht praktikablen Testverfahrens zur Quantifizierung der Wirkung von Desinfektionsmitteln auf Chlamydien in Mikrotiterplatten.

Ein Testverfahren welches die Wirkung verschiedener Desinfektionsmittel auf Chlamydien erfasst, sollte folgenden Kriterien genügen:

Es sollen Desinfektionsmittel in verschiedenen Konzentrationen bei unterschiedlichen Einwirkungszeiten auf ihre Wirksamkeit geprüft werden. Um Material einzusparen und um eine gute Übersichtlichkeit zu gewährleisten, soll das Verfahren in Mikrotiterplatten durchführbar sein.

Die Desinfektionsmittel sollen sowohl mit als auch ohne Eiweißbelastung in vitro getestet werden, um einen Eiweißfehler zu bestimmen. Dadurch sollen der Bedingung bei der klinischer Anwendung Rechnung getragen werden.

Mit dem Verfahren soll eine Reduktion der Bakterien bis zu fünf log₁₀-Stufen überprüfbar sein, um eine bakterizide Wirkung nachweisen zu können (DIN EN 1040, 1997).

Es soll dabei darauf geachtet werden, dass der Versuch mit möglichst geringem personellen und zeitlichen Aufwand durchführbar ist.

Eine Aussage über die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses soll getroffen werden können.

In dem Verfahren soll durch Mitführen einer Kontrolle überprüft werden, ob es durch das Desinfektionsmittel (Wergen, M., 1986) während der Kultivierung zu Schädigungen des Zellrasens kommt.

Weil Neutralisationsstoffe für Desinfektionsmittel ebenfalls eine Zelltoxizität aufweisen (Roesger, M. 1984), soll die Beendigung der Desinfektionsmittelreaktion durch Verdünnung unter Verzicht dieser Stoffe erreicht werden.

2.2 Wirkung von PVP-Iod-Verbindungen und Chlorhexidin auf die Stämme *C. pneumoniae* serovar *TW-183* und das klinische Isolat *HK* sowie *C. trachomatis* serovar *D*.

Mit dem Testverfahren soll die Wirkung von drei verschiedenen PVP-Iod-Verbindungen, darunter als Referenz Betaisodona, sowie von Chlorhexidin auf folgende Chlamydienstämme überprüft werden:

C. pneumoniae serovar *TW-183* und das klinische Isolat *HK*.

C. trachomatis serovar *D*.

Durch Testen mit verschiedenen Spezies und Stämmen soll festgestellt werden, ob Abweichungen in der Desinfektionsmittelwirkung auftreten.

Es soll festgestellt werden, wie stark die Wirkung von der Einwirkungszeit abhängig ist.

Mit Hilfe von sechs verschiedenen Desinfektionsmittelkonzentrationen wird der Bereich der minimalen bis zur maximalen Desinfektionsmittelwirkung bestimmt.

2.3 Erarbeitung einer Empfehlung zur Testung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika gegen Chlamydien.

Es gibt mehrere Richtlinien zur Testung von Desinfektionsmitteln gegen Bakterien und Viren. So wurden unter anderem von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (Gebel, J., 2001), dem Robert Koch-Institut (Robert-Koch-Institut, 1995) und der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG, 1988) mehrere Richtlinien veröffentlicht. In neuester Zeit wurde dazu übergegangen, diese Verfahren als DIN- bzw. als DIN EN-Normen festzulegen (DIN EN 1040, 1997).

Da Chlamydien zwar heute zu den Bakterien gezählt werden, durch ihre intrazelluläre Vermehrung jedoch eine Sonderstellung einnehmen, gibt es für sie keine einheitlichen Testverfahren.

Mit dieser Arbeit soll nun eine Empfehlung erarbeitet werden, wie verschiedene Desinfektionsmittel bei unterschiedlichen Einwirkungszeiten und Konzentrationen auf ihre Wirkung gegen Chlamydien getestet werden können.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Chlamydien

3.1.1 Definition

Chlamydien sind eine Gattung von obligat intrazellulären Bakterien, die sich nur im Innern eukaryonter Zellen vermehren.

3.1.2 Allgemein

Chlamydien gehören zu den Bakterien. Außer einer zytoplasmatischen Membran, einer Zellwand, die derjenigen gramnegativer Bakterien ähnlich ist, enthalten sie DNS, RNS und Ribosomen. Als wesentlicher Unterschied zu anderen Bakterien durchlaufen Chlamydien einen Vermehrungszyklus, der teilweise intrazellulär, teilweise extrazellulär abläuft:

Die extrazelluläre Form ist das Elementarkörperchen. Es handelt sich dabei um ein kugelförmiges Bakterium von 0,25 bis 0,3 µm Durchmesser (Hahn, H., 1994), das von einer dreischichtigen Zellwand umgeben wird. Ein biologisch aktives Endotoxin ist nicht bekannt.

Das Elementarkörperchen ist die Infektionsform der Chlamydien.

Bei den Initial- bzw. Retikularkörperchen handelt es sich um die intrazelluläre Form. Diese entsteht, nachdem die Elementarkörperchen durch Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen wurden. Sie haben einen Durchmesser von 1 µm. Diese nichtinfektiösen Körperchen werden von einer instabilen dreischichtigen Zellwand umgeben.

In der Zelle vermehren sich die Retikularkörperchen durch Zweiteilung und bilden ein vakuolenähnliches Einschlusskörperchen, das nach Untergang der Wirtszelle die neuen Elementarkörperchen freigibt.

C. pneumoniae benötigt alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Lysin, um in Zellkulturen zu wachsen (Kuo, C.-C., 1990). Eigenartigerweise steigert dabei die Reduktion von Lysin von 100% auf 90% und von Methionin von 90% auf 70% das Wachstum von *C. pneumoniae*.

C. trachomatis benötigt alle Aminosäuren außer Threonin.

Eine ultrastrukturelle Studie erbrachte Unterschiede zwischen TWAR und anderen Chlamydien was die Bindung und die Endozytose betrifft (Kuo, C.-C., 1988). Die Elementarkörperchen binden zuerst mit dem spitzen Ende an die Wirtszelle und stellen dann durch Bildung von Zellmembranvorsprüngen andere Bindungen an die Wirtszelle her. Dann treten sie in die Wirtszelle durch Einstülpung der Wirtszellmembran ein und bilden vakuoläre endozytotische Vesikel.

3.1.3 Taxonomie

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung der Chlamydien (Everett, K. D., 1999) auf der Basis der Sequenzhomologien im 16S RNA- und 23S RNA-Gen.

	Name	ATCC Nr.
Familie I: <i>Chlamydiaceae</i>		
<i>Chlamydia muridarum</i> sp. nov.	MoPn ^T	VR 123 ^T
<i>Chlamydia suis</i> sp. nov.	S45 ^T	VR 1474 ^T
<i>Chlamydia trachomatis</i>	A/Har-13 ^T	VR 571B ^T
Biovar trachoma	C/PK-2	
Biovar LGV	L2/434/BU	VR 902B
<i>Chlamydophila abortus</i> sp. nov.	B577 ^T	VR 656 ^T
<i>Chlamydophila caviae</i> sp. nov.	GPIC ^T	VR 813 ^T
<i>Chlamydophila felis</i> sp. nov.	FP Baker ^T	VR 120 ^T
<i>Chlamydophila pecorum</i> comb. nov.	E58 ^T	VR 628 ^T
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> comb. nov.	TW-183 ^T	VR 813 ^T
Biovar TWAR	TW-183	VR 2282
Biovar Koala	LPCon	
Biovar Equine	N16	
<i>Chlamydophila psittaci</i> comb. nov.	6BC ^T	VR 125 ^T
Familie II: <i>Simkaniaceae</i> fam. nov.		
<i>Simkania negevensis</i> sp. nov.	Z ^T	VR 1471 ^T
Familie III: <i>Parachlamydiaceae</i> fam. nov.		
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> sp. nov.	Bn ₉ ^T	VR 1476 ^T
Familie IV:	WSU 86-1044	VR 1470

3.1.4 *C. pneumoniae* Biovar TWAR

3.1.4.1 Allgemein:

C. pneumoniae Biovar TWAR wurde zum ersten mal 1965 aus einem Konjunktivalabstrich eines taiwanesischen Kindes isoliert, das an einem Impfversuch gegen das Trachom teilgenommen hatte (Kuo, C.-C., 1986). Die Isolation fand in einem Dottersack eines Hühnereies statt, der damals einzigen Methode zur Kultivierung von Chlamydien. Als 1971, Zellkulturen zur Verfügung standen, entdeckte man, dass der Organismus TW-183 runde, dichte Einschlüsse in seinen Wirtszellen bildet und somit von der Morphologie her *C. psittaci* viel ähnlicher war, als der von *C. trachomatis*. Das erste Isolat aus dem Respirationstrakt

wurde in Seattle, Washington von einem Studenten mit Pharyngitis gewonnen (Grayston, J. T., 1986).

3.1.4.2 Epidemiologie

Die meisten Aussagen über die Epidemiologie von Infektionen durch *C. pneumoniae* sind auf Studien mit dem für *C. pneumoniae* spezifischen MIF-Test zurückzuführen. Diese Studien zeigten, dass *C. pneumoniae* weltweit eine häufige Ursache für Infektionen ist. Die Seroprävalenz unter Erwachsenen in den Vereinigten Staaten und vielen anderen Ländern liegt bei über 50% und steigt bis zum 80. Lebensjahr bei Männern bis auf 80% und bei Frauen bis auf 65% an. (Forsey, T., 1986, Kanamoto, Y., 1991, Marton, A., 1992, Montes, M., 1992, Wang, S.-P., 1986, 1990). Man wurde 1983 erstmals auf *C. pneumoniae* als Erreger von Infektionen des Respirationstraktes aufmerksam. Durch die Untersuchung von aufbewahrten Seren fand man heraus, dass es sich nicht um einen neuen Erreger handelte, sondern dass er schon seit 1963 regelmäßig Grund für Infektionen war (Aldous, M. B., 1992, Grayston, J. T., 1986).

Eine serologisch nachgewiesene Infektion tritt hauptsächlich bei Kindern im Schulalter auf, vor dem fünften Lebensjahr ist die Serologie meist negativ (Grayston, J. T., 1986). Die Prävalenz steigt zwischen dem fünften und dem vierzehnten Lebensjahr dramatisch an. Ab dem 20. Lebensjahr sind bei 50% der Bevölkerung Antikörper nachweisbar. Die Seroprävalenz steigt weiterhin an, bis zwischen 60. und 80. Lebensjahr 75% positiv sind. Da die Erstinfektion lediglich einen positiven Antikörpertiter für die Dauer von drei bis fünf Jahren hinterlässt, sind Reinfektionen im Laufe des Lebens wahrscheinlich (Patnode, D., 1990).

Bis zu einem Alter von 15 Jahren ist die Seroprävalenz bei beiden Geschlechtern fast identisch, danach ist der Prozentsatz bei Männern höher.

Trotz regional unterschiedlicher Infektionsprävalenz liegt eine weltweite Verbreitung vor, auch wenn sie je nach Region unterschiedlich ist (Forsey, T., 1986). In den Tropen und in weniger entwickelten Ländern ist sie höher, als in nördlichen Ländern, wobei Kanada, Dänemark und Norwegen die kleinsten Infektionsraten aufweisen (Wang, S.-P., 1990). Es gibt Hinweise dafür, dass Infektionen von Kindern unter dem 5. Lebensjahr in den Tropen häufiger sind als in den USA (Saikku, P., 1988).

Menschen stellen das einzige Reservoir für *C. pneumoniae* dar. Die Übertragung erfolgt vermutlich von Mensch zu Mensch durch Sekrete aus dem Respirationstrakt. Bei der Verfolgung von Kontakten infizierter Personen konnten nur wenige Infektionen Zweiter festgestellt werden (Grayston, J. T., 1993, Aldous, M. B., 1992). Untersuchungen beim

Militär erbrachten, dass trotz der Nähe zu Erkrankten keine eindeutigen Hinweise für eine Ansteckung von Kontaktpersonen gefunden werden konnten (Ekman, M.-R., 1993, Kleemola, M., 1988). Dies legt nahe, dass Infektionen von symptomlosen Trägern erworben sein könnten. In anderen Untersuchungen wurde jedoch beobachtet, dass ganze Familien nach der Infektion eines Mitgliedes erkranken (Mordhost, C. H., 1992, 1994). Scheinbar wird der Erreger daher unter manchen Personen besser weitergegeben als unter anderen.

Die Inkubationszeit für Infektionen durch *C. pneumoniae* beträgt einige Wochen und ist damit länger, als die der meisten Nasen-Rachen-Raum-Infektionen (Mordhorst, C. H., 1994). Laboruntersuchungen erbrachten, dass *C. pneumoniae* in Aerosolen bei Raumtemperatur und relativ hoher Luftfeuchtigkeit überleben kann. Obwohl innerhalb von 30 s die Infektiosität um die Hälfte zurückgeht, ermöglicht das Überleben unter diesen Bedingungen die direkte Übertragung von Mensch zu Mensch (Theunissen, H. J. H., 1993).

3.1.4.3 Klinik:

Infektionen des Respirationstraktes:

Infektionen durch *C. pneumoniae* verlaufen oft mit geringen klinischen Symptomen.

Die am stärksten in Erscheinung tretenden sind die atypische Pneumonie und Bronchitis.

Ca. 10% aller Pneumonien und ungefähr 5% aller Bronchitiden und Sinusitiden bei Erwachsenen werden diesem Erreger zugeschrieben (Grayston, J. T., 1992). Eine durch *C. pneumoniae* hervorgerufene Lungeninfektion weist keine spezifische Symptomatik auf. Es gibt jedoch wegweisende Charakteristika, die auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* hinweisen (Grayston, J. T., 1986, 1992, 1993, Thom, D. H., 1990). Ein subakuter Beginn ist häufig. Anfangs findet man oft eine Pharyngitis, die manchmal von Heiserkeit begleitet ist. Es kann zu einem zweiphasigen Verlauf kommen, mit einer sich nach der Anfangsphase abklingenden Pharyngitis, die sich dann zu einer typischen Bronchitis oder Pneumonie entwickelt. Begleitender Husten ist häufig und oft von längerer Dauer. Die Infektion wird selten von Fieber begleitet. Der Zeitraum zwischen Beginn der Erkrankung und dem Arztbesuch ist länger als bei anderen Erkrankungen des Respirationstraktes. Häufig sind die Nasennebenhöhlen mitbetroffen. Bei normaler Leukozytenzahl ist die Blutsenkungsgeschwindigkeit oft erhöht. Die Röntgen-Thorax-Aufnahme zeigt bei milderen, nicht hospitalisierten Fällen lediglich eine subsegmentale Pneumonie. Stärkere oder beidseitige Pneumonien treten meist bei hospitalisierten Patienten auf. Bei sehr schweren Erkrankungsverläufen können auch Pleuraergüsse auftreten. Die meisten Pneumonien verlaufen sehr mild und erfordern keine Hospitalisierung. Jedoch gerade in diesen Fällen dauert die entgültige Erholung trotz angemessener Antibiotikatherapie lange und Husten und

Unwohlsein dauern oft noch für mehrere Wochen an. Bei Älteren verläuft die Erkrankung im Durchschnitt schwerer als bei Jüngeren. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei hospitalisierten Patienten meist noch weitere Erkrankungen vorliegen. Oft besteht zusätzlich eine Pneumokokkeninfektion (Grayston, J. T., 1989, Marrie, T. J., 1987).

Schwere systematische Infektionen:

Schwere systematische Infektionen sind selten, kommen aber vor. Es wurden einige schwere Fälle bekannt, bei denen lediglich eine serologische Antwort auf TWAR nachgewiesen werden konnte. Die fiebrige Erkrankung eines 10jährigen Jungen mit Pneumonie, Pericarditis, Pleuritis und Hepatosplenomegalie wurde beschrieben (Grayston, J. T., 1994).

Andere Syndrome

Im Zusammenhang mit *C. pneumoniae* TWAR wurde von eitriger Sinusitis (Hashigucci, K., 1992) und von Otitis media (Ogawa, H., 1992) berichtet.

Ebenso sind Fälle von Endokarditis (Marrie, T. J., 1990) und lumbosakraler Menigoradikulitis (Michel, D., 1992) bekannt.

Es wird diskutiert, ob *C. pneumoniae* im Zusammenhang mit dem Ausbruch von Asthma bronchiale eine Rolle spielt (Hahn, D. L., 1991). Durch serologische Studien ergaben sich auch Anhaltspunkte dafür, dass *C. pneumoniae* in Verbindung mit Sarkoidose (Grönhagen-Riska, C., 1988.) und Erythema nodosum (Erntell, M., 1989) steht. Das Reiter-Syndrom und die reaktive Arthritis werden ebenfalls mit *C. pneumoniae* in Verbindung gebracht (Rödel, J., 1998; Braun J., 1994).

Koronare Herzkrankheit

Der Zusammenhang zwischen Koronarer Herzkrankheit und *C. pneumoniae* wurde sowohl durch serologische Studien als auch durch den Nachweis des Erregers in atheromatösen Plaques mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Verfahren aufgezeigt (Kuo, C.-C., 1993). Während diese und andere Studien TWAR eindeutig mit atheromatösen Plaques in Verbindung bringen, ist der eindeutige Pathomechanismus noch unklar.

3.1.5 *C. trachomatis*

3.1.5.1 Allgemein:

Bereits 1965 wurde die Kultivierung und elektronenmikroskopische Untersuchung des „Trachomvirus“ beschrieben, welches damals erstmalig in Hühnereiern isoliert wurde (Fujiyama, H., 1965). Aufgrund der Abhängigkeit von der Wirtszelle wurde der Trachomerreger ursprünglich der Gruppe der Viren zugeschrieben. 1972 wurden dann Studien über die Kultivierung von *C. trachomatis* in McCoy-Zellkulturen beschrieben, mit

der die Möglichkeit für weitere Studien geschaffen wurde (Gordon, F. B., 1972). Da Chlamydien eine eigene Zellwand, DNA, RNA und Ribosomen aufweisen, wurden sie schließlich den Bakterien zugeordnet.

3.1.5.2 Epidemiologie

Chlamydia trachomatis serovar *A-C* verursacht das Trachom. Das Trachom ist auch heute noch für 15% aller Erblindungsfälle verantwortlich. So leben heute ungefähr sechs Millionen Menschen weltweit, die durch das Trachom erblindet sind. Des weiteren gibt es schätzungsweise 146 Millionen Fälle einer aktiven Infektion, die behandlungsbedürftig ist, um eine Erblindung zu verhindern (WHO, 1996). Hauptsächlich ist die Erkrankung in Afrika und Asien anzutreffen, vereinzelt sind Infektionen auf der ganzen Welt zu finden. Die Erkrankung wird hauptsächlich durch Fliegen, kontaminierte Handtücher, Finger und Kosmetikstifte verbreitet. Die Erstinfektion findet meist bereits im Kindesalter statt und wird dann im 10. bis 15. Lebensjahr manifest.

Chlamydia trachomatis serovar *D-K* gilt als infektiöses Agens ebenfalls okularer und urogenitaler Erkrankungen. Im Geburtskanal können diese Stämme auf Neugeborene übertragen werden. Bei Neugeborenen mit Atemschwierigkeiten 24 Stunden nach der Geburt konnte in 12,9% der Fälle *C. trachomatis* nachgewiesen werden. Davon waren hauptsächlich Frühgeborene betroffen (Lopez-Hurtado, M., 1999). Außerdem ist *C. trachomatis* serovar *D-K* heute als ein Hauptgrund für die Konjunktivitis bei Neugeborenen anzusehen. Bei einer Untersuchung von 180 Patienten mit ein- oder beidseitiger Manifestation konnten bei 41% eine Chlamydieninfektion festgestellt werden (Salpietro C. D., 1999).

Durch Vorkommen im Genitaltrakt, an der Cervix und Urethra Erwachsener kommt es zur Verbreitung des Erregers beim Geschlechtsverkehr. Bei einer Untersuchung von 431 Studentinnen konnten bei 4,9% Chlamydien aus Genitalabstrichen isoliert werden. 11,9% wiesen Antikörper im Genitalsekret auf (McCormack, W. M., 1985). Bei einer Screeninguntersuchung konnten in Kalifornien bei 9,2% durch direkte Immunfluoreszenz Chlamydien nachgewiesen werden (Weinstock, H. S., 1992). *C. trachomatis* gehört somit sicherlich zu den Geschlechtskrankheiten mit den höchsten Prävalenzen.

Die größte Studie zur Chlamydienprävalenz in Deutschland wurde 1995 und 1996 bei 4381 asymptomatischen Männern und Frauen durchgeführt. Der Chlamydiennachweis erfolgte über eine Urinprobe mittels LCR. Dabei waren bei den Frauen zwischen 15 und 29 Jahren 4,8% und bei den Männern 5,2% positiv. Die Chlamydieninfektion erwies sich als streng altersabhängig. Je jünger sexuell aktive Menschen sind, desto häufiger haben sie eine Chlamydieninfektion (Petersen, E. E., 1996).

3.1.5.3 Klinik

Trachom

Es existieren verschiedene Serovare von *C. trachomatis*. Serovar A-C sind die Verursacher des Trachoms.

Durch Geschlechtsverkehr übertragene Erkrankungen

Serovar D-K sind für die durch Geschlechtsverkehr übertragbaren Erkrankungen verantwortlich (Terho, P., 1982). Dabei zählt die Urethritis zu den am weitest verbreiteten. Es treten Komplikationen wie Prostatitis, Epididymitis und Arthritis auf. Bei Frauen kommt es zur Urethritis und Cervicitis, was zu Salpingitis und in dessen Folge zur extrauteriner Gravidität und tubarer Sterilität führen kann. Außerdem treten Peritonitis oder Perihepatitis auf.

Hauptsächlich unter homosexuellen Männern spielt *C. trachomatis* eine Rolle bei der Entstehung von Proktitiden (Quinn T. C., 1981).

Lymphogranuloma venereum

Das Lymphogranuloma venereum oder Nicolas-Favre-Krankheit wird durch die Serovare L₁-L₃ hervorgerufen und ebenfalls durch Geschlechtsverkehr übertragen. Es kommt hauptsächlich in Afrika vor und befällt meistens Männer. Die auffälligsten klinischen Zeichen sind inguinale und rektale Symptome. Inguinal kommt es meist zu einer unilateralen Lymphknotenschwellung mit Einschmelzungen (Pitche, P. 1998).

Einschlusskonjunktivitis

Die Einschlusskonjunktivitis wird ebenfalls durch die Serovare D-K hervorgerufen. Oft kommt es zur Infektion Neugeborener im Geburtskanal. Dabei können die Symptome auch erst im zweiten Lebensjahr oder später auftreten (Markham, R. H., 1977). Es kommt auch zu Infektionen durch kontaminiertes Badewasser. Es bildet sich ein Bild ähnlich dem des Trachoms heraus.

Neugeborenenpneumonie

Es konnte gezeigt werden, dass *C. trachomatis* auch Pneumonien bei Neugeborenen verursacht. In einer Studie wurden Kinder zwischen der vierten und 24. Lebenswoche, mit chronischer, afibriler Pneumonie sowie erhöhtem IgG und IgM durch nasopharyngeale Abstriche und Serologie auf *C. trachomatis* untersucht.

Es wurde nasopharyngeal *C. trachomatis* sowie eine signifikante Antikörpererhöhung bei 18 von 20 Kindern gefunden. Dabei konnten keine weiteren bekannten Pneumonieerreger nachgewiesen werden (Beem, M. O., 1977).

3.1.6 Antibiotikatherapie

Tabelle 2: Antibiotikatherapie bei Chlamydieninfektionen (CDC, 1998)

Erkrankung	Empfohlene Behandlung	Alternative Behandlung
Unkomplizierte Infektionen des Urogenitaltraktes oder Rektums bei Erwachsenen	Azithromycin 1g oral, einmalige Dosis oder Doxozyklin 2 × 100mg/Tag oral für 7 Tage.	Erythromycin 4 × 500mg/Tag oral für 7 Tage oder Erythromycin Ethylsuccinat 4 × 800mg/Tag oral für 7 Tage oder Ofloxacin 2 × 300mg/Tag oral für 7 Tage.
Infektionen bei Schwangeren oder Schwangere, deren Sexualpartner an nichtgonorrhoeischer Urethritis leiden.	Erythromycin 4 × 500mg/Tag oral für 7 Tage oder Amoxicillin 3 × 500mg/Tag oral für 7 Tage	Erythromycin 4 × 250mg/Tag oral für 14 Tage oder Erythromycin Ethylsuccinat 4 × 800mg/Tag oral für 7 Tage oder Erythromycin Ethylsuccinat 4 × 400mg/Tag oral für 14 Tage oder Azithromycin 1g oral, einmalige Dosis.
Chlamydien-Einschlusskonjunktivitis bei Neugeborenen	50mg/kg/Tag Erythromycin auf 4 Tagesportionen verteilt für 10-14 Tage.	
<i>C. trachomatis</i> -Pneumonie bei Kleinkindern	50mg/kg/Tag Erythromycin auf 4 Tagesportionen verteilt für 10-14 Tage	
Ambulant erworben <i>C. pneumoniae</i> -Pneumonie (Vogel, F., 2000)	Makrolid für 7-10Tage	

3.2 Grundlagen der Desinfektion und der Desinfektionsmittel

3.2.1. Definition der Desinfektion

Von einer Desinfektionsmaßnahme wird gefordert, dass sie auf einem Objekt die Keimzahl in dem Maße reduziert, dass von dort keine Infektion mehr ausgehen kann.

In dieser Definition ist einerseits dem häufig nicht zu erbringenden Nachweis der Apathogenität des Infektionserregers nach der Desinfektion und andererseits der quantitativen Reduktionsrate Rechnung getragen worden.

Was die quantitative Reduktionsrate betrifft, so ist eine Reduktion der Prüfkeime um 5 log₁₀-Stufen nachzuweisen (DIN EN 1040, 1997).

Auch die DGHM fordert in ihren „Standardmethoden der DGHM zur Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren“ diese Reduktionsrate (Gebel, J., 2001).

3.2.2 Chemische Desinfektion

Bei der chemischen Desinfektion erfolgt eine Abtötung (Bakterien) oder irreversible Schädigung (Viren) der Mikroorganismen, die nach Art der eingesetzten Wirkstoffgruppen unterschiedlich ist. Dazu gehören unter anderen: Membranblockade, Permeabilitätsstörungen, Enzymblockade, Freisetzung bzw. Koagulation des Zytoplasmas.

3.2.2.1 Anforderungen an ein optimales Desinfektionsmittel (Fiedler, K., 1995)

- sichere Abtötung bzw. irreversible Schädigung von Mikroorganismen bei breitem Wirkungsspektrum.
- kurze Einwirkungszeit und Wirkung in geringer Konzentration.
- geringe Aggressivität gegenüber den zu desinfizierenden Materialien.
- leichte Löslichkeit in Wasser und gute Schmutzlöslichkeit. Dies ist vor allem von Flächendesinfektionsmitteln zu fordern.
- gute Stabilität, d. h. Haltbarkeit und Beständigkeit gegenüber Umwelteinflüssen.
- keinen Eiweißfehler, d. h. keinen Aktivitätsverlust durch organische Substanzen: Es kann zur Bildung von Schutzhüllen um den Mikroorganismus kommen. Durch Eiweißfällung kann die Koagulation der Außenschicht des Schutzkolloides erfolgen, was ein weiteres Eindringen des Desinfektionsmittels verhindert.
- keinen Seifenfehler, d. h. keinen Aktivitätsverlust durch Seife. Verschiedene Desinfektionsmittel werden durch Seifen sowie andere anionische Detergentien inaktiviert. Dies spielt weniger bei der Schleimhautdesinfektion als viel mehr bei der Händedesinfektion eine Rolle.
- möglichst keine oder nur geringe Geruchsbelästigung.
- Unschädlichkeit für Menschen und Tiere, z. B. kein Auftreten von Haut- und Schleimhautreizungen, Hautverträglichkeit zumindest in der Gebrauchsverdünnung, keine toxischen Wirkungen.
- gute Umweltverträglichkeit.
- Wirtschaftlichkeit.

3.2.3 Bestimmung des Eiweißfehlers

Wie oben schon beschrieben, kann an die Mikroorganismen gebundenes Eiweiß durch Binden von Desinfektionsmittel dessen Aktivität eingeschränkt werden.

Um diesem Phänomen Rechnung zu tragen, wird dem Testaliquot ein bestimmter Prozentsatz von Eiweiß zugegeben. Dabei werden jedoch von verschiedenen Autoren ganz unterschiedliche Prozentanteile an Eiweiß gefordert.

Tabelle 3: Proteinanteil zur Bestimmung des Eiweißfehlers

<u>Quelle</u>	<u>Anteil des Serums</u>
Schmidt, J., 1968	20%
DIN EN 1276, 1997	Die Belastungssubstanz muss je nach den Anwendungsbedingungen, die für das Produkt festgelegt wurden, ausgewählt werden.
Hingst, V., 1990	0,2 % Kälberserum
BGA, 1982	0,2 %, 10 %
Gebel, J., 2001	0,3 % Albumin + 0,3% Schafererythrozyten
DVG, 1988	20 %, 40 %
DIN EN 1656, 1995	0,3 %, 1 %
DIN EN 1276, 1997	0,03%, 0,3 %

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Prozentsatz von 10% verwendet.

Je nach Fragestellung ist der Eiweißanteil jedoch den Anwendungsbedingungen des Produktes anzupassen (DIN EN 1276, 1997).

3.2.4 Chlorhexidin

Chlorhexidin ist eines der am häufigsten zur Schleimhautdesinfektion verwendeten Desinfektionsmittel. Es wird besonders in oral angewendeten Produkten und als Konservierungsmittel verwendet. Dies liegt an der Breitbandwirkung und guten Verträglichkeit. Reizungen wurden beschrieben, dürften aber in vielen Fällen produktspezifisch sein (Gardner, J. F., 1991, Rosenberg A., 1976).

Chlorhexidin weist viele Vorteile auf, seine Aktivität ist aber vom pH-Wert abhängig und wird bei der Anwesenheit von organischen Substanzen außerordentlich verringert (Russell, A. D., 1993).

Es wurde ein großer Aufwand betrieben, um den Wirkungsmechanismus dieses wichtigen Bisbiguanides zu erforschen (Ranganthan, N. S., 1996). Hauptsächlich wurde seine Wirkung

auf nichtsporenbildende Bakterien untersucht (Hugo, W. B., Russell, A. D., 1993, 1995, 1996, 1996a).

Trotzdem sind genügend Daten über seine Wirkung auf Sporen, Mykobakterien, Hefen, Protozoen und Viren verfügbar. Chlorhexidin ist eine bakterizid wirkende Substanz (Denyer, S. P., 1995, Hugo, W. B.).

Die Interaktion mit Bakterien und die Aufnahme durch diese wurden von Hugo et al. als Erstes untersucht (Hugo, W. B., 1964, 1965, 1966). Er fand heraus, dass die Aufnahme von Chlorhexidin durch *Escherichia coli* und *Staphylokokkus aureus* sehr schnell abläuft und von der Chlorhexidinkonzentration sowie dem pH-Wert abhängt.

Unlängst wurde unter Verwendung von Chlorhexidingluconat das Aufnahmevermögen der Substanz durch Bakterien geprüft, wobei das Maximum nach 20 s erreicht wurde (Fitzgerald, K. A., 1989). Schädigung findet an den äußeren Zellschichten statt, welche jedoch nicht ausreicht, um die Zelllyse bzw. den Zelltod hervorzurufen (El-Moug, T., 1985).

Die Substanz durchquert dann die Zellwand bzw. die äußere Membran. Dies geschieht vermutlich durch passive Diffusion. Daraufhin greift das Chlorhexidin nachträglich die zytoplasmatische bzw. innere Membran oder die Membran von Hefen an.

In Hefen verteilt sich Chlorhexidin in der Zellwand, der Plasmamembran und im Zytoplasma (Hiom, S. J., 1993).

Auf die Zerstörung der anfälligen semipermeablen Membranen folgt nun die Leckage der intrazellulären Bestandteile, was sich durch entsprechende Techniken nachweisen lässt.

Die Leckage ist an sich nicht Ursache der zellulären Inaktivierung, sondern die Folge des Zelltodes (Russell, A. D., 1988.).

Hohe Konzentrationen an Chlorhexidin bewirken das Gerinnen von intrazellulären Bestandteilen.

Zuerst gerinnt das Zytoplasma, dann folgt der Abfluss durch Leckage (Hugo, W. B. 1964, 1965, 1966, Longworth, A. R., 1971), so dass es einen biphasischen Effekt auf die Membranpermeabilität gibt.

Das Ausmaß der Leckage nimmt mit der Zunahme der Chlorhexidinkonzentration zu, wobei nach Erreichen einer bestimmten Konzentration diese aufgrund der Zytosolgerinnung wieder abnimmt.

Harold et al. postulierte, Chlorhexidin müsse ein Hemmer der membrangebundenen und gelösten Adenosintriphosphatase sowie der Nettokaliumaufnahme bei *Enterococcus faecalis* sein (Harold, F. M., 1969).

Jedoch inhibieren nur hohe Biguanidkonzentrationen die membrangebundene Adenosintriphosphatase, woraus sich schließen lässt, dass das Enzym keinen primären Angriffspunkt für Chlorhexidin darstellt (Chopra, I., 1987).

Da Chlorhexidin das Membranpotential zusammenbrechen lässt, ist anzunehmen, dass dies den eigentlichen Wirkungsmechanismus darstellt (Barett-Bee, K., 1994, Kuyyakanond, T., 1992).

Die Chlorhexidinwirkung auf Hefezellen wird wahrscheinlich der auf Bakterien ähnlich sein (Hiom, S. J., 1992, 1993, 1995, 1995a).

Chlorhexidin hat auf die Protoplastenlyse ebenfalls eine biphasische Wirkung, so dass es auch hier mit höherer Biguanidkonzentration zu geringeren Lyseeffekten kommt (Hiom, S. J. 1996).

Zunehmende Konzentrationen von Chlorhexidin (bis zur Höhe von 25 µg/ml) rufen eine fortschreitende Lyse von *Saccharomyces cerevisiae* Protoplasten hervor, die sich ebenso mit höheren Biguanidkonzentrationen wieder verringert (Hiom, S. J., 1993).

Es liegen Arbeiten vor, die zeigen, dass Chlorhexidin einen ähnlichen Effekt auf den Trophozoiten von *Acanthamoeba castellanii* hat, wobei festzustellen ist, dass deren Zysten unempfindlicher sind (Khunkitti, W., a, b, 1996, 1997, 1997a).

Furt prüfte die Wirkung von Chlorhexidin und anderen Bioziden auf *Acanthamoeba* nach und zeigte, dass Membranschädigungen bei diesen Protozoen einen signifikanten Faktor für ihre Inaktivierung darstellen (Furr, J. R., a).

Mykobakterien sind im Allgemeinen sehr resistent gegenüber Chlorhexidin (Russell, A. D., 1996b).

Über die Aufnahme von Chlorhexidin und anderen Antiseptika und Desinfektionsmitteln durch Mykobakterien und über die biochemischen Veränderungen in den behandelten Keimen ist wenig bekannt.

Mycobacterium avium-intracellulare ist erheblich resistenter als andere Mykobakterien (Bradley, C. R., 1996).

Chlorhexidin ist nicht sporozoid. Gerade hohe Konzentrationen des Bisbiguanides beeinflussen die Lebensfähigkeit von Bazillussporen bei Umgebungstemperaturen nicht (Shaker, L. A., 1988, 1988a), obgleich eine ausgeprägte sporozoide Wirkung bei erhöhten Temperaturen erzielt werden kann (Shaker, L. A., 1986).

Vermutlich treten dabei zunehmend Veränderungen im Sporenaufbau auf, die eine gesteigerte Aufnahme des Biguanides bewirken, obwohl dies noch nicht experimentell gezeigt werden konnte.

Es ist wenig bekannt über die Aufnahme von Chlorhexidin durch Bakteriosporen, außer dass mantellose Formen größere Mengen des Präparates aufnehmen, als es bei „normalen“ Sporen der Fall ist (Shaker, L. A., 1988a).

Chlorhexidin hat wenig Wirkung auf die Auskeimung von bakteriellen Sporen (Russell, A. D. 1990, 1995, 1977, 1985) hemmt aber deren Auswuchs (Russell, A. D. 1985).

Der Grund für die fehlende Wirkung auf den ersten Vorgang bei signifikanter Beeinflussung des letzteren ist unklar.

Jedoch könnte dies durch die relativ geringe Aufnahme von Chlorhexidin durch keimende Zellen im Vergleich mit derer ausgewachsener Formen erklärt werden (Shaker, L. A., 1988a).

Die Rezeptoren könnten in keimenden Zellen in ihrer Anzahl reduziert oder maskiert sein.

Die antivirale Aktivität von Chlorhexidin ist variabel. Studien mit verschiedenen Typen von Bakteriophagen haben gezeigt, dass Chlorhexidin keinen Effekt auf MS2 oder K. E. coli-Phagen hat (Maillard, J.-Y., 1994).

Auch hohe Konzentrationen scheitern bei der Inaktivierung der *Pseudomonas aeruginosa*-Phage F116 und zeigen weder Wirkung auf die Phagen-DNA innerhalb des Capsids noch auf die Phageneiweiße (Maillard, J.-Y., 1995).

Der Transduktionsablauf war gegenüber Chlorhexidin und anderen Bioziden stärker empfindlich als der Phage selbst. Ein früheres Ergebnis belegt, dass Chlorhexidin schlecht an F 116 Partikel bindet. (Maillard, J.-Y., 1995a).

Chlorhexidin wird nicht als besonders effektiver antiviraler Wirkstoff erachtet. Seine Aktivität beschränkt sich auf lipidschichtumschlossene Viren (Park, J. B., 1989).

Chlorhexidin inaktiviert hüllenlose Viren wie das Rotavirus (Springthorpe, V. S., 1986), das Hepatitis-A-Virus (Mbithi, J. N., 1990) oder das Polio-Virus (Best, M., 1994) nicht immer.

3.2.5 Iod und Iodophore

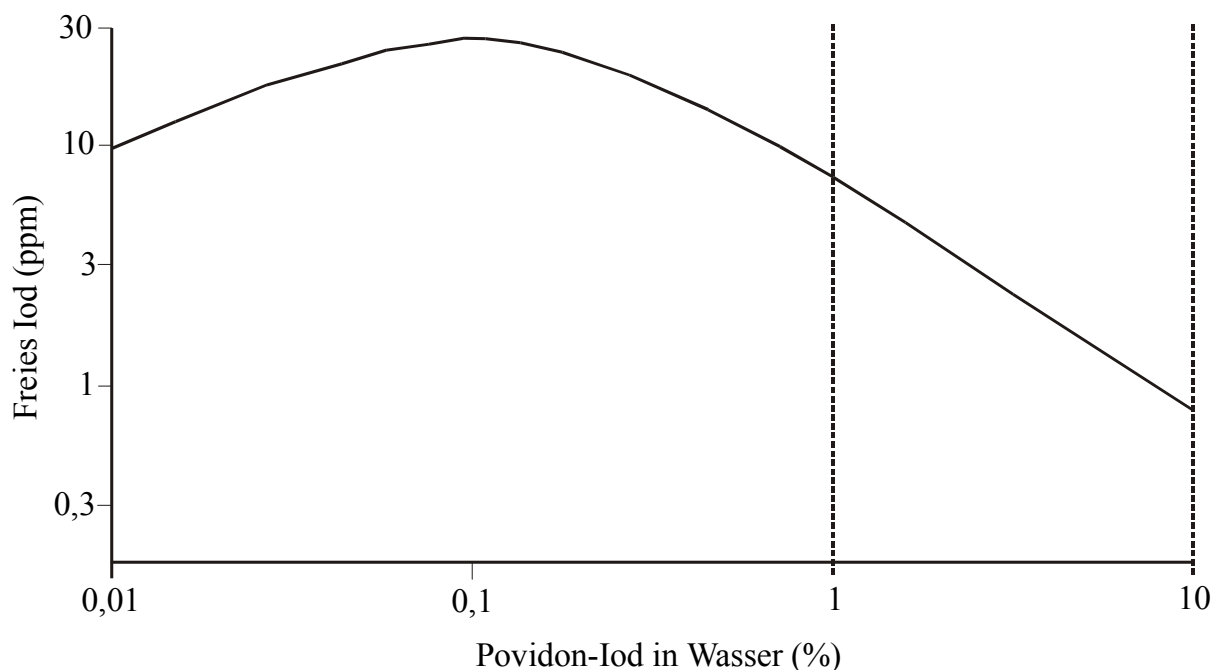
Obwohl die Wirkung von Iod schwächer ist als die von Chlor, wirkt es schnell bakterizid, fungizid, tuberkulozid, viruzid, und sporozid (Gottardi, W. 1991). Wässrige oder alkoholische Iodlösungen (Tinkturen) werden seit 150 Jahren als Antiseptika benutzt. Nachteilig sind die mit ihrer Anwendung einhergehenden Verfärbungen und teilweise auftretenden Reizungen.

Darüber hinaus, sind wässrige Lösungen im Allgemeinen instabil. In Lösungen befinden sich mehrere Iodarten in einem komplexen Gleichgewicht, wobei hauptsächlich molekulares Iod (Anderson, R. L., 1990) für die antimikrobielle Wirkung verantwortlich ist (Gottardi, W., 1991).

Um den wirksamen Iodanteil in wässrigen Lösungen zu erhöhen, wurden Iodophore entwickelt. Dabei handelt es sich um Trägersubstanzen, die als Speicher des aktiven „freien“ Iodes fungieren (Gottardi, W. 1991). Die am häufigsten in Antiseptika und Desinfektionsmitteln verwendeten Iodophore sind Povidon-Iod und Poloxame-Iod. In Povidon-Iod liegt das Iod in dreifacher Form vor: als komplex gebundenes Iod als freies nicht komplex gebundenes Iod und als Iodid. Dabei wird die Summe aus komplex gebundenem und freiem Iod als verfügbares Iod bezeichnet. Dieser Anteil ist durch die Herstellung bedingt nicht konstant und liegt zwischen 0,9 und 1,2%. Die Summe aus verfügbarem Iod und Iodid wird Gesamtiod genannt. Wie oben beschrieben darf der Gehalt des freien Iodes (I_2) nicht zu niedrig sein, da die mikrobizide Wirkung von einem ausreichend hohen Gehalt des freien Iodes abhängt, zu hoher Gehalt an freiem Iod führt jedoch zu Nebenwirkungen wie z. B. Haut- und Schleimhautreizungen.

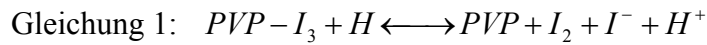
In üblichen Anwendungskonzentrationen von 1-10% in Wasser mit guter mikrobizider Wirkung und ohne Nebenwirkungen liegt das freie Iod zwischen 1ppm und 10ppm vor (siehe Abb. 1).

Abbildung 1: Abhängigkeit des Gehaltes an freiem Iod (I_2) von der Povidon-Iod-Konzentration. (Hartke, K., 1998)



Nach Auflösung von Povidon-Iod in Wasser stellt sich zwischen freiem und komplexiertem Iod ein konstantes Gleichgewicht in Abhängigkeit von der Povidon-Iod-Konzentration ein. Kinetische Untersuchungen zeigten, dass nach dem Verbrauch des freien Iodes z. B. durch Reaktion mit Proteinen von Bakterien in Millisekunden neues Iod aus dem Komplex freigesetzt wird, um das Gleichgewicht wieder einzustellen. Als direkter Wirkstoff kann

deshalb das freie Iod (I_2) betrachtet werden. Der Gehalt an freiem Iod hängt von verschiedenen Parametern ab. Neben einer guten Synthese haben auch die Konzentrationen an Iodid und an Protonen einen Einfluss wie aus Gleichung 1 zu sehen ist (Hartke, K., 1998).



Obwohl die keimtötende Aktivität aufrechterhaltenen ist, werden Iodophore gegen bestimmte Pilze und Sporen als weniger wirksam erachtet als Tinkturen (Rutala, W. A., 1995).

Vergleichbar mit Chlor, setzt die antimikrobielle Wirkung von Iod sogar bei geringen Konzentrationen schnell ein, der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch unbekannt.

Iod dringt schnell in Mikroorganismen ein (Chang, S. L., 1971) und greift an Schlüsselgruppen von Proteinen an. Diese Angriffsstellen sind die freien schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin (Gottardi, W., 1991, Kruse, W. C., 1970), Nukleotide und Fettsäuren (Apostolov, K., 1980, Gottardi, W., 1991). Dieser Vorgang gipfelt im Zelltod (Gottardi, W., 1991).

Über die antivirale Wirkung von Iod ist wenig bekannt. Man weiß aber, dass Viren ohne Lipidmembran, wie die Parvoviren unempfindlicher als lipidumhüllte Viren sind (Prince, H: N., 1991).

Wahrscheinlich greift Iod ähnlich wie bei Bakterien an den Oberflächeneiweißen von umhüllten Viren an. Möglicherweise kommt es mit ungesättigten Kohlenstoffbindungen der Membranfettsäuren zu destabilisierenden Reaktionen (Springthorpe, V. S., 1990).

4. Material und Methoden

4.1 Chlamydien

Für die Versuche werden zwei verschiedene Spezies verwendet.

4.1.1 Chlamydia trachomatis serovar D (IC CAL 8)

Es wird ein mykoplasmenfreier Stamm verwendet, der in McCoy-Zellen vermehrt wurde. Der Titer des Aliquots beträgt $3,0 \times 10^9$ IFU/ml. Damit werden die mindestens geforderten 5×10^8 KBE/ml weit überschritten (DIN EN 12353, 1996). Um den Versuch richtig auswerten zu können, wird eine Ausgangskonzentration von 2×10^8 IFU/ml für den PVP-Iod-Versuch bzw. 5×10^8 IFU/ml für den Chlorhexidinversuch angestrebt. Dies entspricht der geforderten Konzentration von $1,5 - 5 \times 10^8$ KBE/ml für die Bakterienprüfsuspension (DIN EN 1040, 1997). Die Verwendung verschiedener Ausgangskonzentrationen für die beiden Versuche ist durch den unter 4.2.2 beschriebenen unterschiedlichen Versuchsablauf zu erklären. Dazu wird das Aliquot im Verhältnis 1:15 bzw. 1:6 mit PBS verdünnt.

Dabei ist darauf zu achten, dass das PBS entweder 0 % FKS oder 10 % FKS enthält, je nach dem, ob die Desinfektionsmittelwirkung ohne oder unter Eiweißbelastung getestet werden soll.

PBS ist eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Zusammensetzung siehe Anhang).

Der pH-Wert des Puffers liegt bei $7,0 \pm 0,2$. Dieser pH-Wert entspricht dem zur Prüfung von Desinfektionsmitteln geforderten Wert (DIN EN 1040, 1997).

4.1.2 Chlamydia pneumoniae serovar TW-183

Es handelt sich um einen mykoplasmenfreien Stamm, der in BGM-Zellen vermehrt wurde. Der Titer des Ausgangsaliquots beträgt in der ersten Charge $3,0 \times 10^9$ IFU/ml bzw.

$1,7 \times 10^9$ IFU/ml in der zweiten, neuen Charge. Die Verdünnung erfolgt wie bei

C. trachomatis entsprechend 1:15 in der ersten, bzw. 1:8,5 in der zweiten Charge für den PVP-Iod-Versuch, sowie 1:6 in der ersten, bzw. 1:3,4 in der zweiten Charge für den Chlorhexidinversuch. Ebenso wird mit dem klinischen Isolat *HK* verfahren, dass zur Untersuchung von Wirkungsunterschieden innerhalb derselben Spezies verwendet wird.

4.1.3 Chlamydia pneumoniae klinisches Isolat HK

Hierbei handelt es sich um eine klinisches Isolat, das am 17.12.1992 aus dem Rachenabstrich einer Patientin mit Pharyngitis im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität isoliert wurde. Das in dieser Arbeit verwendete Aliquot durchlief die 13. Passage.

Tabelle 4: Übersicht zum Verdünnungsverhältnis der Chlamydien

Desinfektions- mittel	Stamm	Charge	Titer des Ausgangsaliquots	Verdünnungsverhältnis
PVP-Iod Versuchsbeginn mit 2×10^8 IFU/ml (DIN 1040, 1997)	C. <i>trachomatis D</i>	1	$3,0 \times 10^9$	1:15
	C. <i>pneumoniae</i> <i>TW-183</i>	1	$3,0 \times 10^9$	1:15
		2	$1,7 \times 10^9$	1:8,5
	C. <i>pneumoniae</i> <i>HK</i>	1	$3,0 \times 10^9$	1:15
Chlorhexidin Versuchsbeginn mit 5×10^8 IFU/ml (DIN 1040, 1997)	C. <i>trachomatis D</i>	1	$3,0 \times 10^9$	1:6
	C. <i>pneumoniae</i> <i>TW-183</i>	1	$3,0 \times 10^9$	1:6
		2	$1,7 \times 10^9$	1:3,4
	C. <i>pneumoniae</i> <i>HK</i>	1	$3,0 \times 10^9$	1:6

4.2 Desinfektionsmittel

PVP-Iod-Liposome 2,5% (enthält 2,5% PVP-Iod) in verschiedenen Verdünnungen.

PVP-Iod-Liposome 5% (enthält 5% PVP-Iod) in verschiedenen Verdünnungen.

Betasisodona Lösung (enthält 10% PVP-Iod) in verschiedenen Verdünnungen.

Chlorhexidin in verschiedenen Konzentrationen.

4.3 Desinfektionsmittelreaktion

4.3.1 Vorversuch:

Im Vorversuch werden verschiedene wirksame Konzentrationen des Desinfektionsmittels eingegrenzt.

Bei der Herstellung der einzelnen Verdünnungen ist darauf zu achten, dass es bei der Zugabe des Desinfektionsmittels zu den Chlamydien zu einer weiteren Verdünnung im Verhältnis 1:2

kommt. Die vorbereitete Verdünnung muss also doppelt so hoch konzentriert sein wie die angestrebte Endkonzentration.

Soll zum Beispiel eine Verdünnung von 1:12,5 getestet werden, so muss diese im Verhältnis 1:6,25 hergestellt werden. Dabei wird zur Bestimmung des Wirkungsbereiches davon ausgegangen, dass das Desinfektionsmittel bei der therapeutischen Anwendung im Überschuss vorhanden ist und somit eine Verdünnung unter die verabreichte Konzentration erst langsam erfolgt.

4.3.2 Hauptversuch:

Im Hauptversuch werden von den acht vorgetesteten Desinfektionsmittelkonzentrationen diejenigen sechs ausgesucht, mit denen sich die Wirksamkeit am besten darstellen lässt.

Davon müssen mindestens zwei im wirksamen Bereich liegen (DIN 1040, 1997).

Als Einwirkungszeiten werden 0,5 min, 1 min und 5 min ausgewählt.

Es werden 50 µl PVP-Iod-Verdünnung mit 50 µl Chlamydiensuspension, bzw. 80 µl Chlorhexidinverdünnung mit 20 µl Chlamydiensuspension zur Reaktion gebracht, wobei sich somit bei Reaktionsbeginn in beiden Fällen eine Chlamydienkonzentration von 10^8 IFU/ml ergibt.

Die unterschiedlichen Mischverhältnisse in den beiden Versuchsanordnungen sind dadurch bedingt, dass sich Chlorhexidin in PBS dauerhaft nur bis zu einer Konzentration von 0,05% bzw. für kurze Zeit bis 0,25% lösen lässt (Weiss, H., 1986). Im Chlorhexidinversuch sollen Endkonzentration bis 0,2% getestet werden, da dies den Anwendungskonzentrationen der kommerziell erhältlichen Chlorhexidinprodukten entspricht (Rote Liste, 2002).

Um die zu erreichen werden 80 µl Chlorhexidinverdünnung mit 20 µl Chlamydiensuspension zur Reaktion gebracht.

Sollen höhere Konzentrationen getestet werden, so ist es nötig, die Chlamydien- und Chlorhexidinverdünnung nur in Aqua dest. vorzunehmen. Dabei ist darauf zu achten, dass es durch den fehlenden Puffer bereits hier zu einer Bakterienreduktion kommen kann, auch wenn dieser in dazu durchgeführten Versuchen verschwindend gering war. In diesem Falle sollte allerdings nicht auf eine entsprechende Kontrolle verzichtet werden.

Zur Übertragung der verschiedenen Desinfektionsmittelkonzentration auf die Chlamydien wird eine programmierbare, mikroprozessorgesteuerte 8-fach-Multipipette vom Typ Eppendorf Response/Multi-channel mit einem Einstellungsbereich von 5 – 100 µl verwendet. Durch die mit elastischen Dichtungsringen versehene Verbindungsstücke zwischen Pipette und Pipettenspitze wird die Genauigkeit erhöht.

Dies führt laut Herstellerangaben zu folgenden Fehlerwerten:

Tabelle 5: Fehlerwerte der 8-fach-Multipipette vom Typ Eppendorf Response/Multi-channel

Pipetteneinstellung	Unrichtigkeit	Unpräzision
10 µl	$\pm 2,0 \%$	$\leq 2,0 \%$
100 µl	$\pm 0,8 \%$	$\leq 2,5 \%$

Unrichtigkeit = systematischer Fehler,

Unpräzision = zufälliger Fehler.

Dies erfolgt auf der sogenannter Reaktionsplatte nach folgendem Schema: (siehe Abb. 2/3).

[illegible][illegible]

Bei der Reaktionsplatte handelt es sich um eine 96-well-Mikrotiterplatte mit Boden in U-Form. Nach Beginn der Reaktion durch Übertragung der Desinfektionsmittelverdünnung auf die Chlamydien wird die Pipette auf Mischmodus gestellt und die Suspension durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Die Reaktion läuft bei Zimmertemperatur (20° C) ab.

Dies entspricht der Aufbewahrungstemperatur für die aufgetaute Chlamydien suspension sowie der Prüftemperatur (DIN 1040, 1997).

Nach abgelaufener Reaktionszeit wird das Reagieren des Desinfektionsmittels mit den Chlamydien durch Ausverdünnung auf der Verdünnungsplatte beendet.

Dazu werden 20 µl Chlamydien mit Desinfektionsmittel auf 180 µl Verdünnungslösung (VL) übertragen. In den Reihen A und B der Reaktionsplatte werden Vorwert 1 (VW₁) und Vorwert 2 (VW₂) bestimmt. Dabei dient VW₁ als Kontrolle ohne und VW₂ als Kontrolle mit Restdesinfektionsmittel nach Verdünnung. Dafür werden auf der Platte in diesen Reihen in die Näpfe A/B 1, 5, 9 je 100 µl PBS vorgelegt, von denen je 50µl bzw. 80 µl auf die Chlamydien übertragen werden.

Aufgrund der Handhabung wird die Reaktion für 0,5 min getrennt von der für 1 min und 5 min, gestartet, da sonst durch Zeitmangel der ordentliche Verdünnungsvorgang zur Beendigung der Desinfektionsmittelreaktion nicht gewährleistet ist. Wie in den Abbildungen 2 und 3 zu sehen, werden deshalb auf der Reaktionsplatte zwei gleiche Reaktionsbereiche pro Versuchsanordnung vorbereitet.

4.4 Beendigung der Desinfektionsmittelreaktion durch Verdünnung

Nach der vergangenen Reaktionszeit werden die Proben sofort verdünnt, um eine weitere Einwirkung des Desinfektionsmittels so gut wie möglich zu verhindern. Das Verdünnungs-Neutralisationsverfahren ist das Mittel der Wahl (DIN EN 1040, 1997). Zur Verdünnung und Neutralisierung von Resten der Desinfektionsmittel wird eine Verdünnungslösung (VL) aus PBS unter Zugabe von 2% FKS hergestellt. Die Verdünnung erfolgt nach dem folgenden Schema: (siehe Abb. 4).

Abbildung 4: Verdünnungsschema zur Beendigung der Desinfektionsmittelreaktion:

	0,5 min				1 min				5 min			
	Strich 1	Strich 2	Strich 3	Strich 4	Strich 1	Strich 2	Strich 3	Strich 4	Strich 1	Strich 2	Strich 3	Strich 4
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	180 µl VL + 20 µl aus RPl. +10 µl Verd.1	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl. +10 µl Verd. 1	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl. +10 µl Verd. 1	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl
B	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl
C	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl
D	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl
E	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl
F	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl
G	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl
H	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	180 µl VL + 20 µl aus RPl.	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl	➔ 180 µl VL 20 µl

Man erhält dabei folgende Verdünnungsstufen:

Strich 1 (1:10): Es werden 20 µl Reaktionsprobe in 180µl VL übertragen.

Strich 2 (1:100): Es werden 20 µl Strich 1 in 180µl VL übertragen.

Strich 3 (1:1.000): Es werden 20 µl Strich 2 in 180 µl VL übertragen.

Strich 4 (1:10.000): Es werden 20 µl Strich 3 in 180 µl VL übertragen.

Die viermalige Verdünnung erfolgt erstens zur maximalen Reduktion der Nachwirkung des Desinfektionsmittels und zweitens, um die Auszählung der Einschlussbildenden Einheiten unter dem Mikroskop zu ermöglichen.

Dabei ist es wichtig, dass die Verdünnung auf U-Boden-Mikrotiterplatten stattfindet, wodurch der nach jeder Übertragung nötige Mischvorgang besser gewährleistet ist.

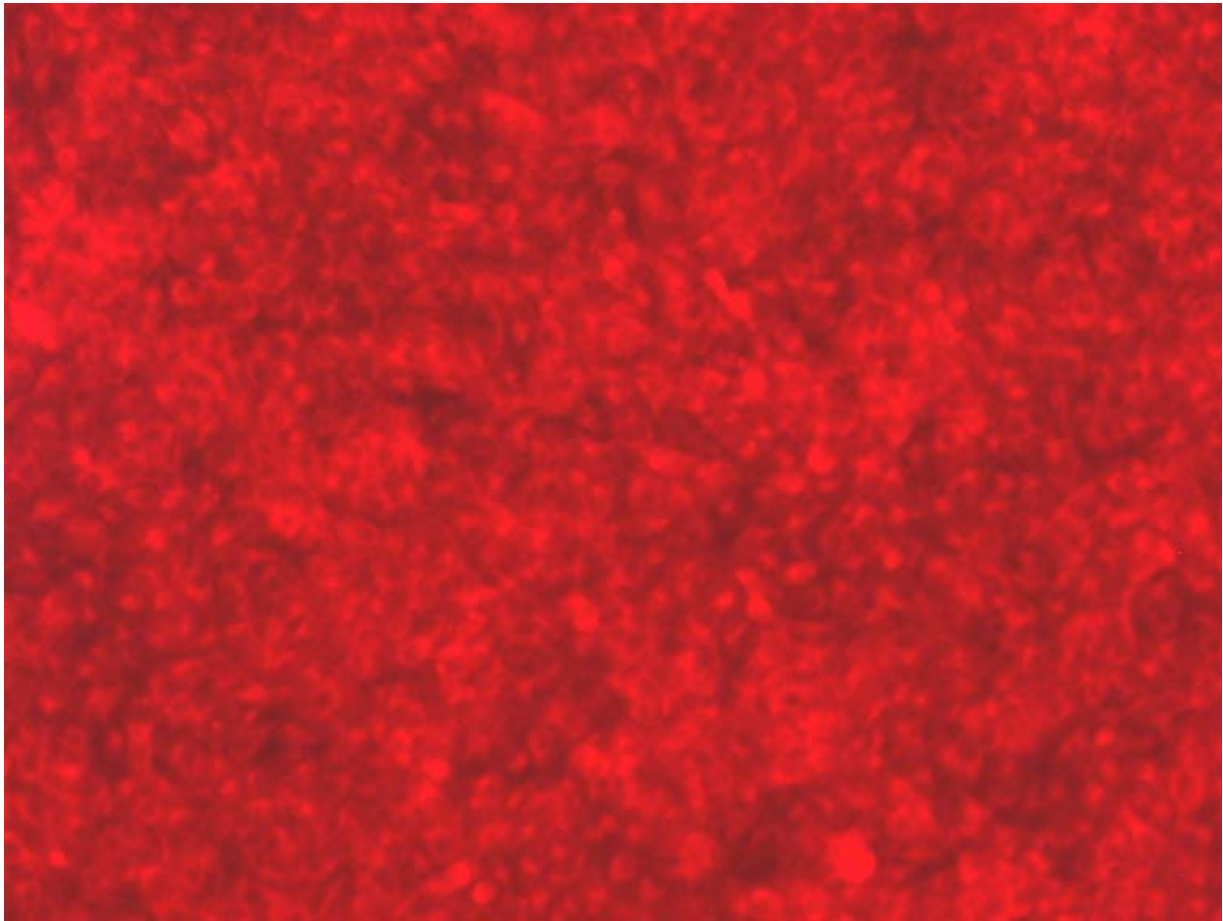
Da mit Hilfe von VW_2 die Restwirkung des Desinfektionsmittels nach der Verdünnung und die zelltoxische Wirkung überprüft werden sollen, werden auf der Verdünnungsplatte 10 μ l der 1. Stufe der Desinfektionsmittelverdünnung in den Napf der späteren Strich 1-Verdünnung gegeben. Dies entspricht auf der Verdünnungsplatte den Nöpfen A1, A5 und A9. Dabei wird von folgendem ausgegangen: Vorausgesetzt der VW_2 – der für die höchste Desinfektionsmittelkonzentration bestimmt wird – ist ungefähr gleich dem VW_1 , so ist die Restwirkung und die Toxizität auf die BGM-Zellen für alle Desinfektionsmittelkonzentrationen zu vernachlässigen.

4.5 Übertragung auf Zellen

Nach erfolgter Reaktion und Verdünnung erfolgt die Übertragung der Chlamydiensuspension auf Zellen, um die noch vermehrungsfähigen Elementarkörperchen an Hand von Einschlusskörperchen nachzuweisen.

Dafür werden BGM-Zellen auf 96-well-Flachbodenmikrotiterplatten einen Tag vor Versuchsbeginn eingesät. Es werden 200 μ l Dulbecco's mod. Eagle Medium unter Zusatz von 10% FKS mit 4×10^4 Zellen in jeden Napf gegeben und in einem CO_2 -Brutschrank der Firma Heraeus Instruments vom Typ BB 6060 bebrütet. Sie bilden einen dichten Zellrasen auf dem Boden der Nöpfe (siehe Abbildung 5):

Abbildung 5: Geschlossener und vitaler Zellrasen unter dem Fluoreszenzmikroskop



Nach Entnahme der vorbereiteten Zellplatten aus dem Brutschrank wird das Medium abgesaugt und von der Verdünnungsplatte je 100µl des verdünnten Desinfektionsmittel-Chlamydien-Gemisches in den entsprechenden Napf übertragen.

4.6 Zentrifugation

Um die Inokulation der noch vitalen Elementarkörperchen zu optimieren, werden die beimpften Platten zentrifugiert.

Es wird eine Zentrifuge mit geschlossenen Bechern der Firma Hettich vom Typ Rotanta 96 RSC verwendet.

Je nach Stamm werden die Platten unter folgenden Bedingungen zentrifugiert:

Tabelle 6: Zentrifugationsdaten

	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. trachomatis</i>
Zentrifugalbeschleunigung :	2000g	4000g
Temperatur :	37°C	37°C
Dauer:	30 min	60 min

4.7 Chlamydienkultur

Nach der Zentrifugation erfolgt der Mediumwechsel und die Bebrütung. Nach vorsichtiger Absaugung des Überstandes - der Zellrasen muss beim Absaugen möglichst unverletzt bleiben - wird dieser durch 200µl/Napf serumfreies Medium SF-3 , Panserin-1, der Firma Cytogen unter Zusatz von Cycloheximid 1µg/ml der Firma Serva ersetzt.

Die Inkubation erfolgt im Inkubator bei 37° C und 5% CO₂. Dabei werden *C. trachomatis* für 40 Stunden, *C. pneumoniae* für 72 Stunden inkubiert.

4.8 Fixierung und Färbung

Nach der Inkubation wird nach folgendem Schema der Vermehrungszyklus unterbrochen, um später die möglichst noch vollständig erhaltenen Einschlusskörperchen unter dem Mikroskop zählen zu können:

Zuerst wird das Medium in einer Sicherheitswerkbank entfernt, indem die Mikrotiterplatte auf eine dicke Lage Fließpapier gestürzt wird. Von erneutem Absaugen wird abgesehen, um den Zellrasen zu schonen. Es folgt das Fixieren mit $\geq 99,8$ %igem Methanol. Nach Abgießen des Methanols erfolgt ein zweites Mal die Zugabe von Methanol, welches für mindestens 5 Minuten auf die Zellen einwirken soll.

Nach erneutem Entfernen des Methanols folgt das Waschen mit 100µl 0,1%igem PBS-Tween 20 pro Napf. Dann wird mit fluoreszenzmarkiertem chlamydienspezifischem Antikörper gefärbt.

Bei *C. trachomatis* werden 20 µl FITC-markierte Antikörper, die gegen das Hauptprotein der Außenmembran MOMP spezifisch sind, zugegeben. Dabei wurde hier Serum aus dem MicroTrak®-Test der Firma Trinity biotech verwendet. Die mitgelieferte Trockensubstanz wird mit 3 ml des beiliegenden Rekonstitutions-Verdünners aufgelöst und hinterher im Verhältnis 1:10 mit 0,1%igem PBS-Tween 20 und etwas Evansblue verdünnt.

Das zugegebene Evansblue dient der Kontrastierung des Zellrasens.

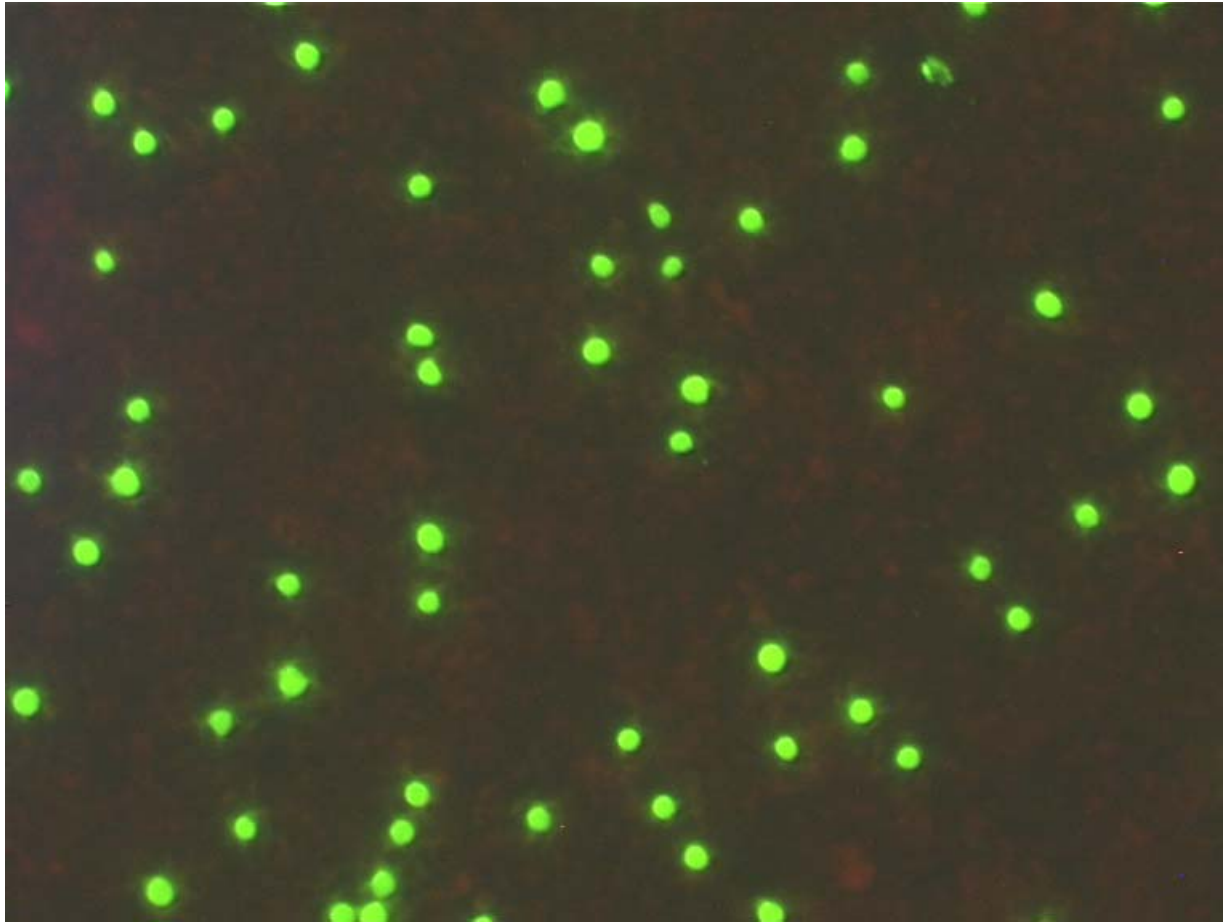
Die Anfärbung von *C. pneumoniae* erfolgt mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper gegen LPS. Es wurde Imagen™ Chlamydia der Firma DAKO verwendet. Der Antikörper wird im Verhältnis 1:5 wie oben verdünnt und 20 µl in jeden Napf pipettiert. Daraufhin erfolgt eine mindestens einstündige Inkubation bei 37° C.

Nach der Inkubation wird der Antikörper abgegossen und der Zellrasen mit 100 µl 0,1%igem PBS-Tween 20 gewaschen.

Zum Abschluss erfolgt das Auftragen von 100 µl PBS-Glycerin mit einem Mischungsverhältnis von 1:10.

Nun sind die Einschlusskörperchen unter dem Mikroskop gut sichtbar (siehe Abbildung 6):

Abbildung 6: Einschlusskörperchen unter dem Fluoreszenzmikroskop



4.9 Mikroskopie

Die Mikroskopie erfolgt mit einem Umkehrmikroskop vom Typ IX 70 der Firma Olympus mit Fluoreszenzeinrichtung. Es werden je nach Menge und Größe der Einschlusskörperchen diese entweder im Gesichtsfeld des Mikroskopes oder in einem Zählquadrat ausgezählt. Pro Napf werden jeweils 10 Felder ausgewertet und daraus der Mittelwert gebildet. Bei großer Anzahl an Einschlusskörperchen werden die Näpfe der Strich 3 und 4 Verdünnung ausgewertet, bei abnehmender Anzahl gewinnen die Verdünnungen Strich 1 und 2 an Bedeutung. Um Vergleichswerte zu erhalten, werden mit Hilfe der erhaltenen Mittelwerte die Anzahl der Einschlusskörperchen je nach Verdünnung mit 1, 10, 100 oder 1000 multipliziert und mit von der Objektivvergrößerung abhängenden Umrechnungsfaktoren auf die gesamte Napffläche hochgerechnet. So erhält man, je nach dem, welches Objektiv zum Einsatz kommt und ob man im gesamten Gesichtsfeld oder nur in einem Zählquadrat auszählt, folgende Berechnung:

Tabelle 7: Umrechnungsfaktoren für Zählquadrat:

Vergrößerung	l (Quadrat) in μm	l (Quadrat) in mm	A (Quadrat) in mm^2	A (Mirkotiterpl) in mm^2 (bei $r=3,1\text{mm}$)	Umrechnungsfaktor $= A(\text{Mtp})/A(\text{Quadr.})$
10 fach	1000	1,00	1,00	30,19	30
20 fach	500	0,50	0,25	30,19	121
40 fach	240	0,24	0,06	30,19	524
60 fach	160	0,16	0,03	30,19	1179
10 fach (x1,5)	660	0,66	0,44	30,19	69
20 fach (x1,5)	330	0,33	0,11	30,19	277
40 fach (x1,5)	165	0,17	0,03	30,19	1109
60 fach (x1,5)	106	0,11	0,01	30,19	2687

Tabelle 8: Umrechnungsfaktoren für Gesichtsfeld

Vergrößerung	r (Gesichtsfeld) in μm	r (Gesichtsfeld) in mm	A (Gesichtsfeld) in mm^2	A (Mirkotiterpl) in mm^2 (bei $r=3,1\text{mm}$)	Umrechnungsfaktor $= A(\text{Mtp})/A(\text{Gesf.})$
10 fach	1100	1,10	3,80	30,19	8
20 fach	550	0,55	0,95	30,19	32
40 fach	265	0,27	0,22	30,19	137
60 fach	175	0,18	0,10	30,19	314
10 fach (x1,5)	730	0,73	1,67	30,19	18
20 fach (x1,5)	365	0,37	0,42	30,19	72
40 fach (x1,5)	182,5	0,18	0,10	30,19	289
60 fach (x1,5)	115	0,12	0,04	30,19	727

4.10 Berechnung und Auswertung

Nach Mittelung (M) der erhaltenen Werte aus den auswertbaren Verdünnungen werden diese zu Vorwert 2 in Relation gesetzt. Dafür ist Voraussetzung, dass sich Vorwert 2 und Vorwert 1 nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Dabei dient VW_1 als Kontrolle ohne und VW_2 als Kontrolle mit Restdesinfektionsmittel nach Verdünnung. Zur Bestimmung werden auf der Reaktionsplatte die Näpfe A/B 1, 5, 9 je 100 μl PBS vorgelegt, von denen je 50 μl bzw. 80 μl auf die Chlamydien übertragen werden.

Die Berechnung des sogenannten Reduktionsfaktors (Hingst, 1990) erfolgt nach folgender Formel: $RF = \log_{10}(VW_2) - \log_{10}(M)$.

Nach dreimaliger Wiederholung des Versuches unter gleichen Bedingungen wird aus den drei erhaltenen Reduktionsfaktoren das arithmetische Mittel gebildet. Dieser wird in Abhängigkeit zur Desinfektionsmittelverdünnung in einem Diagramm aufgetragen.

Für jeden Wert wird der Standardfehler des arithmetischen Mittels berechnet und als Fehlerbalken ins Diagramm eingetragen.

Für den Standardfehler des arithmetischen Mittels gilt:

$$\text{Gleichung 2: Standardfehler: } \hat{s} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

\hat{s} = Standardfehler, s = Standardabweichung, n = Anzahl der Messwerte.

4.11 Versuchsdurchführung

Um einen möglichst raschen und reibungslosen Versuchsablauf zu gewährleisten, ist folgende Reihenfolge für die Versuchsdurchführung einzuhalten:

- Herstellung von PBS + 2 % FKS.
- Einpipettieren von 180 µl PBS + 2 % FKS pro Napf auf die drei Verdünnungsplatten.
- Bei der Testung unter Eiweißbelastung Herstellung von PBS + 10 % FKS.
- Einpipettieren von 100 µl PBS in die Näpfe 1; 3; 5; 7; 9; 11; A-F der Reaktionsplatte für die spätere Herstellung der Desinfektionsmittelverdünnungsreihe.
- Bei Testung von PVP-Iod werden nun die Desinfektionsmittelverdünnungen auf die Reaktionsplatte pipettiert und die Verdünnungsreihe hergestellt.
- Wird der Versuch mit Chlorhexidin durchgeführt, so erfolgt nun die Vorverdünnung des Chlorhexidin in Aqua dest., um der Fällung des Chlorhexidin in PBS entgegenzuwirken. Bei einer 20 %igen Ausgangslösung wird eine 1,25 %ige und eine 2,5 %ige Vorverdünnung wie folgt hergestellt:

2,5 %: 150µl Chlorhexidin + 2250µl Aqua dest. = 2400 µl.

1,25% : 150 µl Chlorhexidin + 1050 µl Aqua dest. = 1200 µl.

- Es werden für jede der drei Versuchsdurchführungen die Röhrchen für die Endverdünnung in PBS wie folgt vorbereitet:
0,25 %: 4500 µl PBS in Reagenzglas
0,125 % 2700 µl PBS in Reagenzglas
- Es folgt das Auftauen des Chlamydienliquots und die Verdünnung mit PBS bzw. PBS + 10 % FKS. bis zum oben beschriebenen Ausgangstiter.
- Es werden in jeden Napf der Spalten 2; 4; 6; 8; 10 und 12 auf der Reaktionsplatte für den Chlorhexidinversuch 20 µl und für den PVP-Iod-Versuch 50µl Chlamydien suspension einpipettiert.
- Im Falle der Chlorhexidintestung werden erst jetzt für jeden Versuch getrennt die Desinfektionsmittelendverdünnungen hergestellt, um ein möglichst kurze Kontaktzeit des Chlorhexidins mit dem PBS zu gewährleisten.

Dies geschieht wie folgt:

0,25 %: 500 µl der vorbereiteten Verdünnung in a. d. in die bereitgestellten 4500 µl PBS.

0,125 %: 300 µl der vorbereiteten Verdünnung in a. d. in die bereitgestellten 2700 µl PBS.

- Es folgt die restliche Verdünnungsreihe auf der Reaktionsplatte.

- Nun werden 10 μ l der Verdünnungsstufe 1 in die Npfe A 1, A 5, und A 9 der Verdünnungsplatte pipettiert, um VW_2 bestimmen zu können.
- Starten der Desinfektionsmitteleinwirkung.

5. Ergebnisse

Als Ergebnis der Desinfektionsmittelwirkung auf die Chlamydien sind die Reduktionsfaktoren der Einschlussbildenden Einheiten anzusehen. Diese drücken aus, um wie viele Zehnerpotenzen das Ausgangsinokulum durch die Einwirkung des Desinfektionsmittels auf die Chlamydien vermindert wird. Der Reduktionsfaktor wird somit als Logarithmus zur Basis 10 ausgewiesen. Der hier dargestellte Mittelwert der Reduktionsfaktoren resultiert aus den Werten der drei mal unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuche. Die bestimmten Mittelwerte der Reduktionsfaktoren sind im Anhang zu finden.

Des Weiteren sind aus den Tabellen, die aus diesen Werten resultierenden Standardfehler abzulesen. Diese wurden als Fehlerindikatoren in die graphischen Abbildungen eingearbeitet.

Der Reduktionsfaktor wurde in einem Diagramm in Abhängigkeit zur Desinfektionsmittelverdünnung dargestellt.

Alle Werte größer oder gleich fünf, wurden als fünf in das Schaubild übernommen, da eine noch höhere Reduktion der Keimzahlen mit der Versuchsanordnung nicht erfasst werden kann.

5.1 PVP-Iod

Im Fall von PVP-Iod wurden die Ergebnisse für den selben Stamm, die selbe Einwirkungsdauer bei gleicher FKS-Konzentration in einem Schaubild dargestellt, um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu schaffen.

5.1.1 Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* ohne FKS-Belastung

Abbildung 7: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* bei 0,5 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung

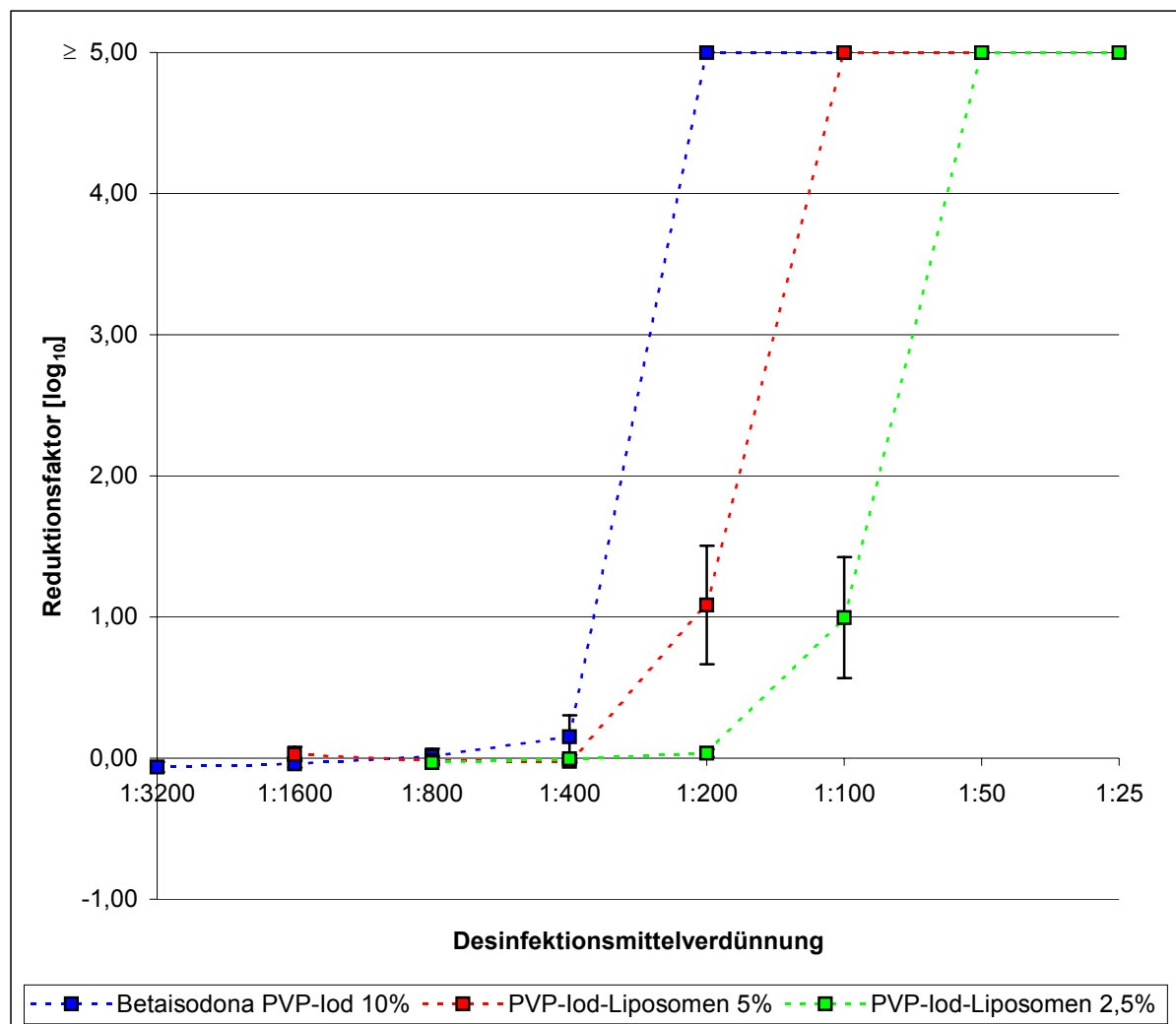


Abbildung 8: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* bei 1 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung

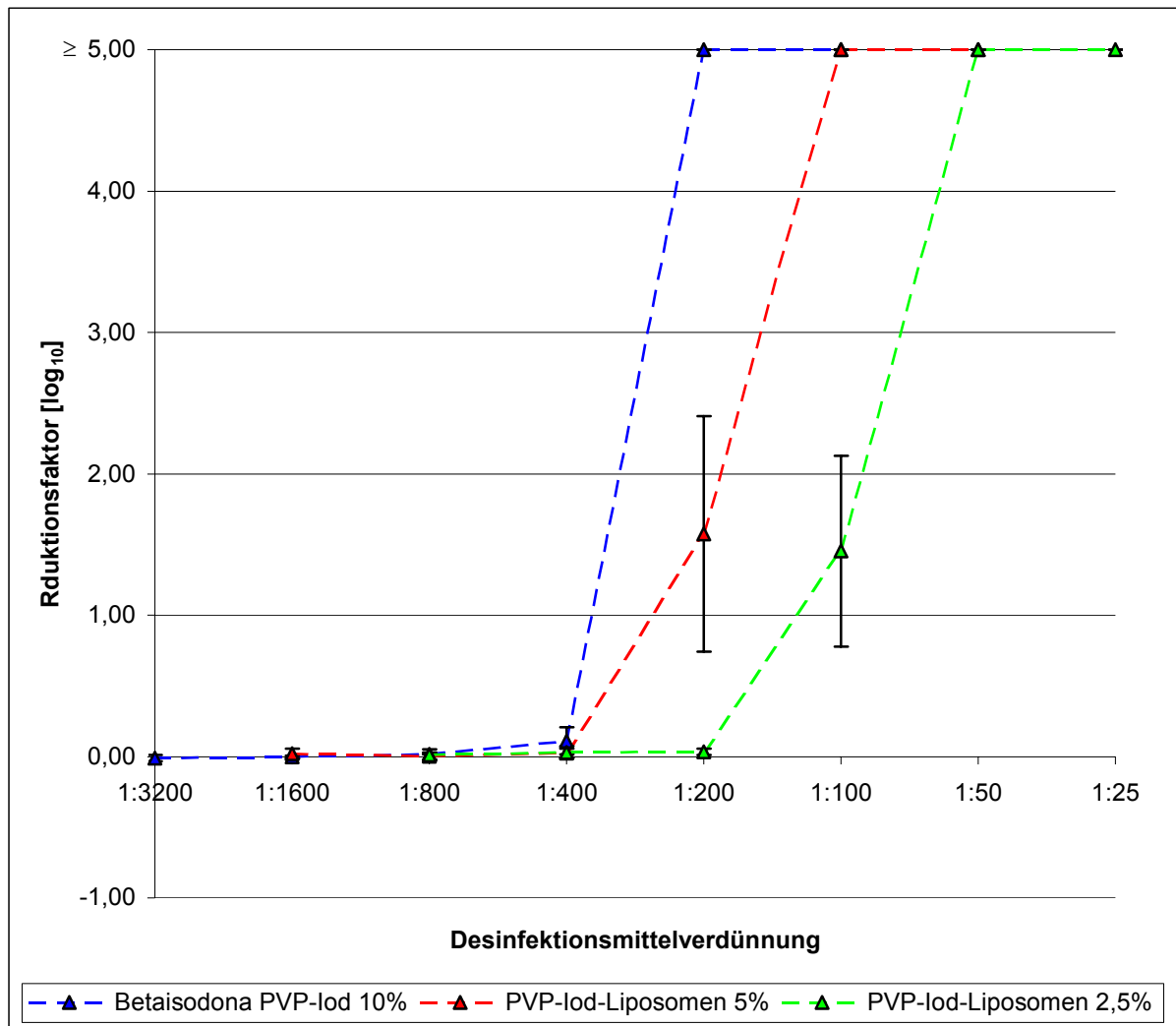
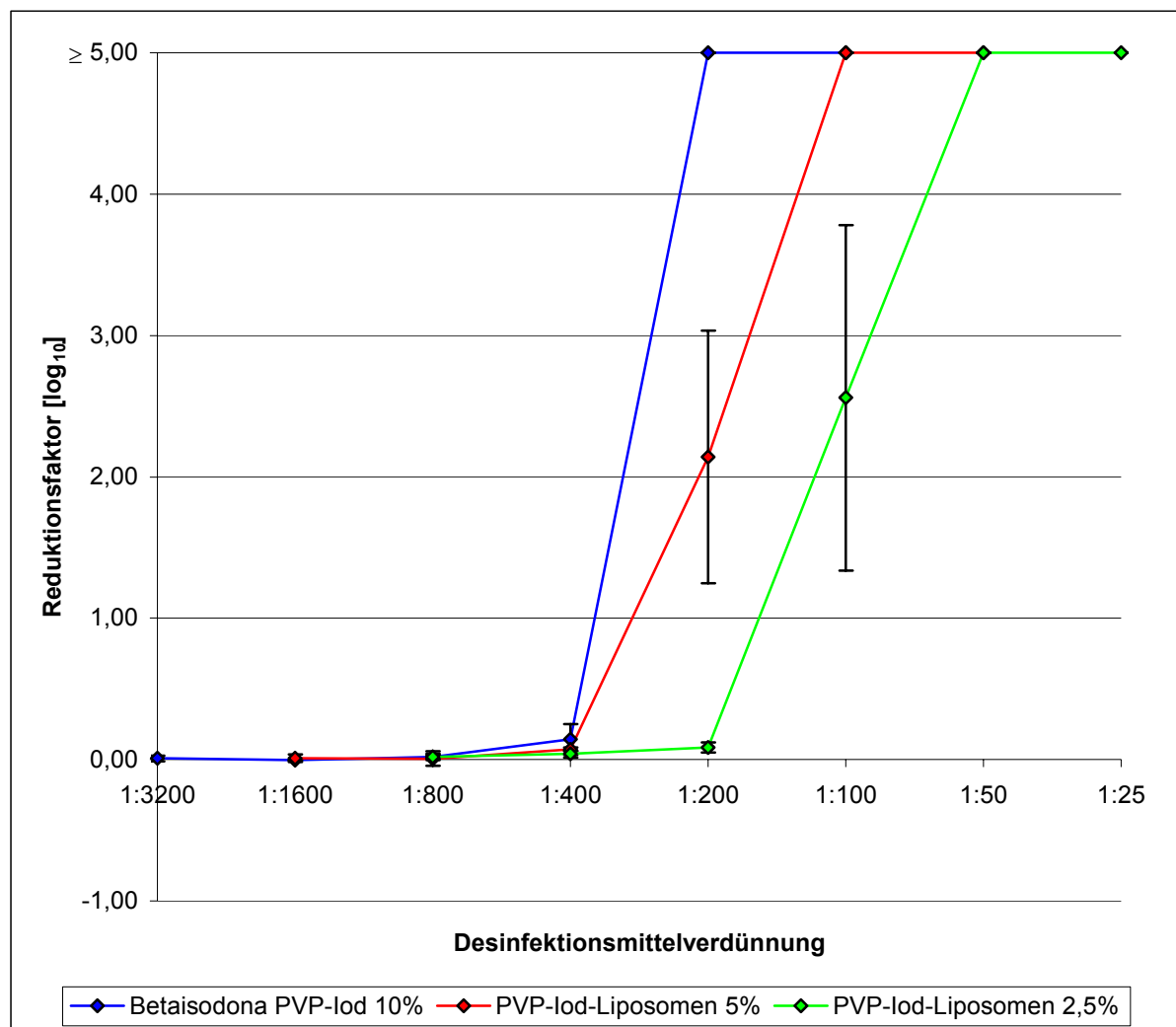


Abbildung 9: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* bei 5 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung



5.1.2 Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* mit 10% FKS-Belastung

Abbildung 10: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* bei 0,5 min Reaktionszeit und 10% FKS-Belastung

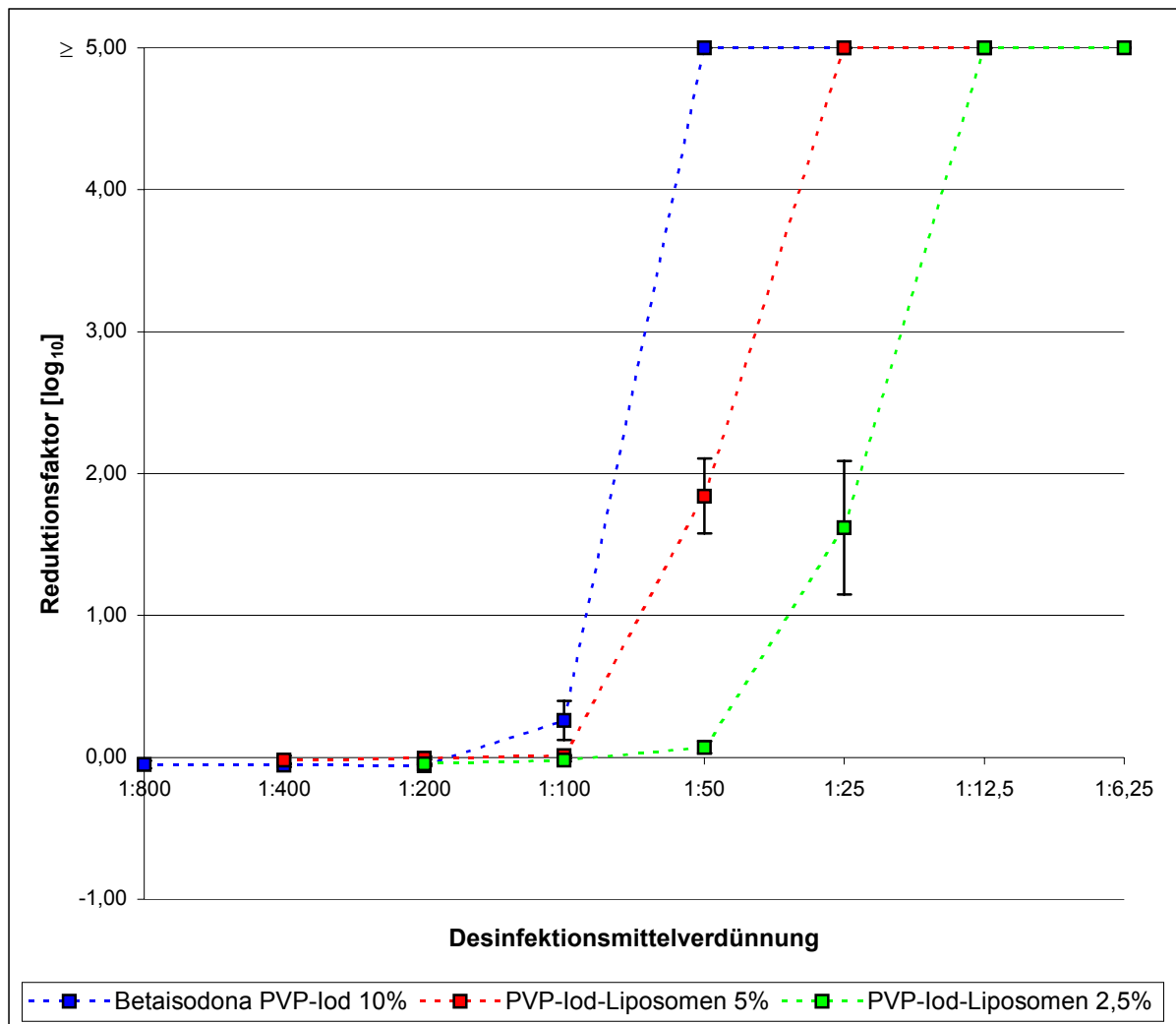


Abbildung 11: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* bei 1 min Reaktionszeit und 10% FKS-Belastung

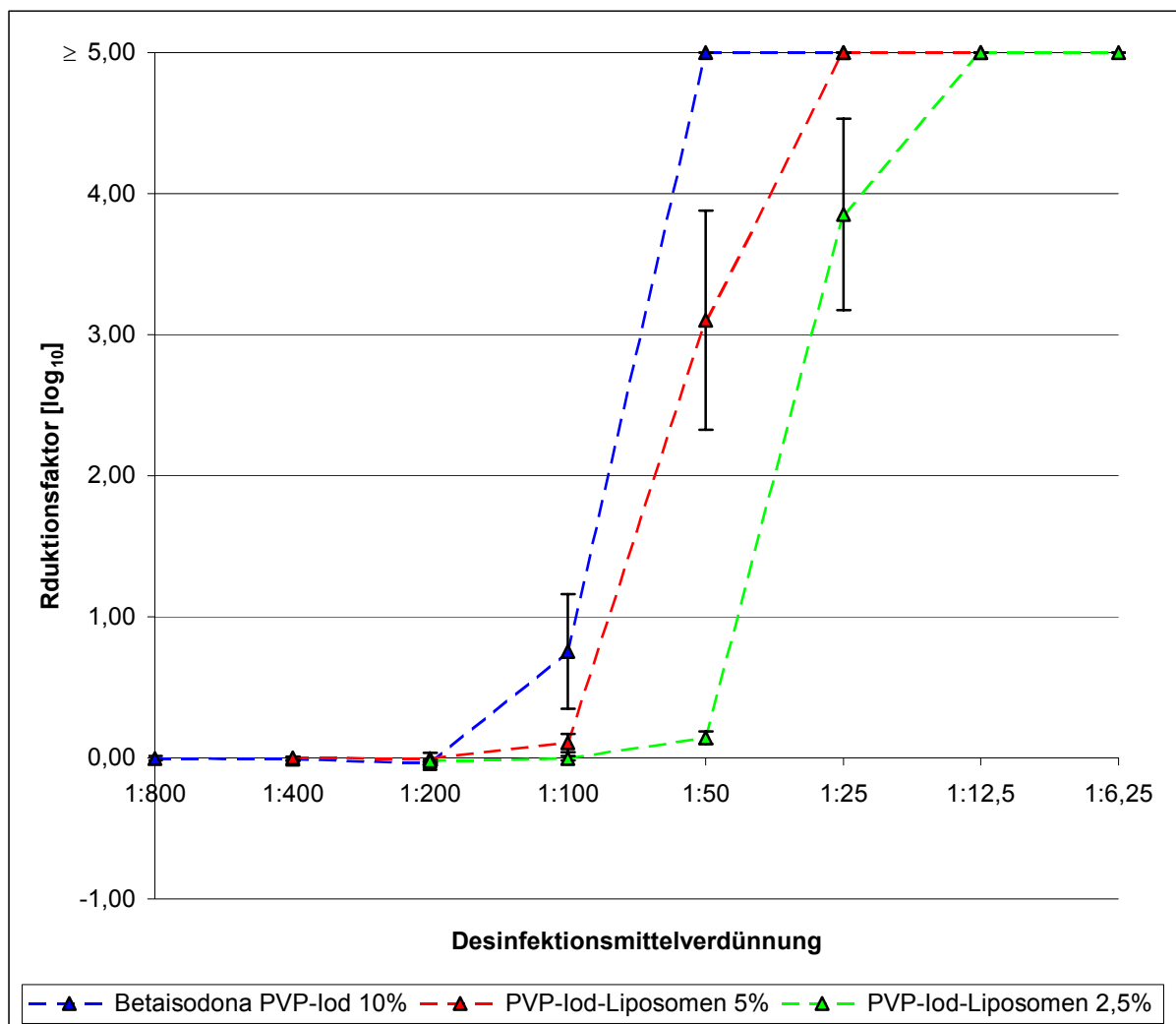
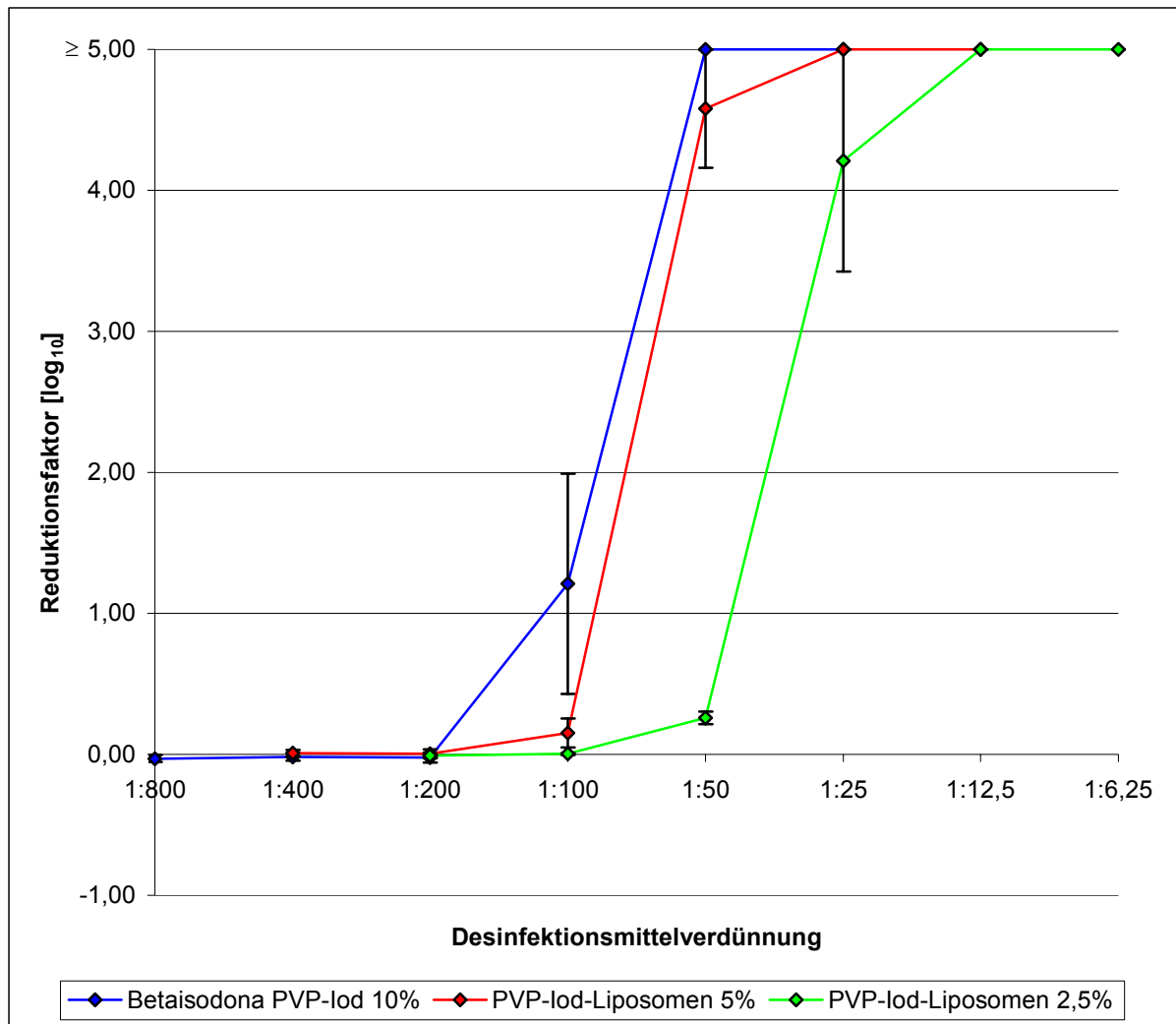


Abbildung 12: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* bei 5 min Reaktionszeit und 10% FKS-Belastung



5.1.3 Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* ohne FKS-Belastung

Abbildung 13: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* bei 0,5 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung

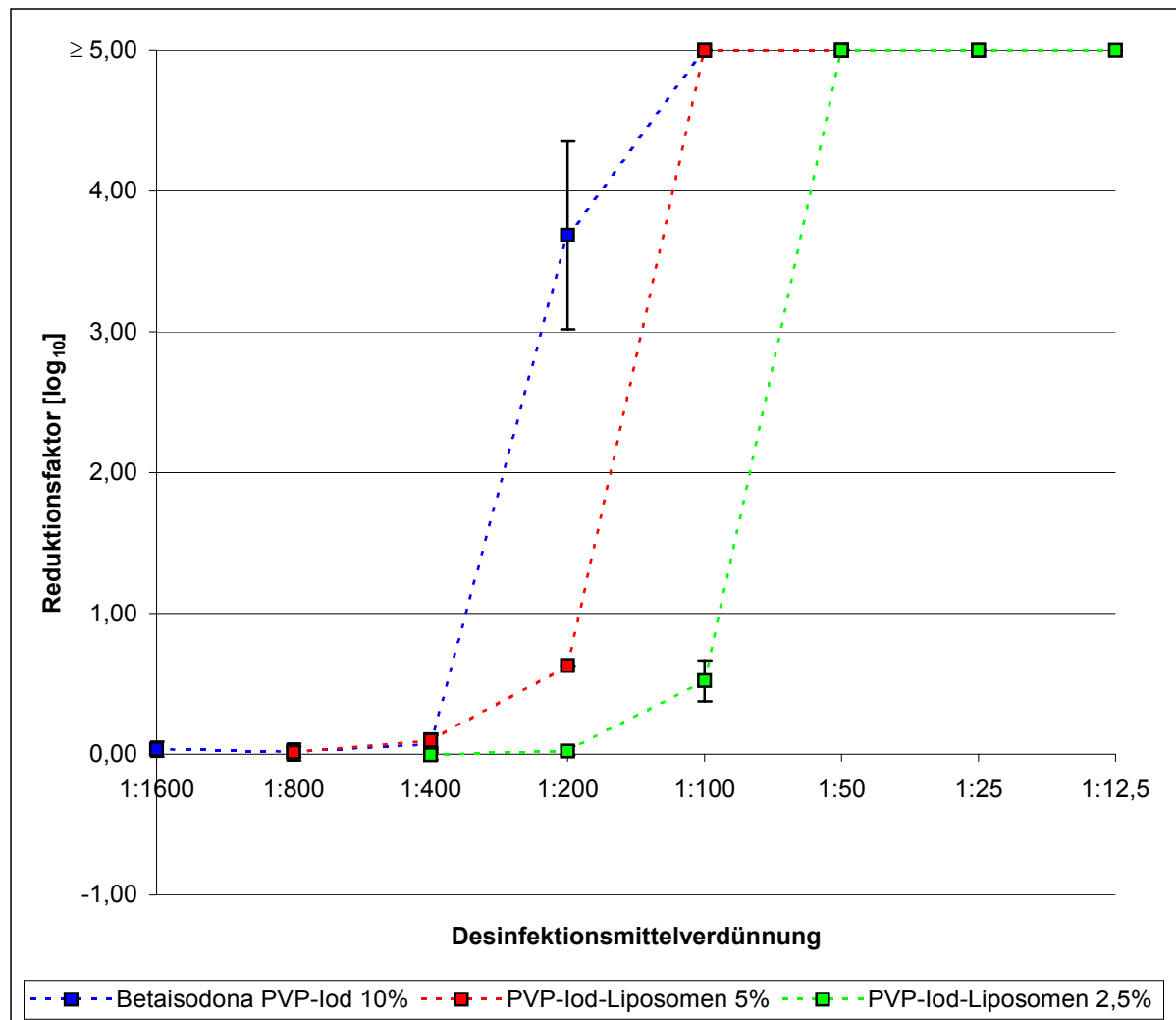


Abbildung 14: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183*
bei 1 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung

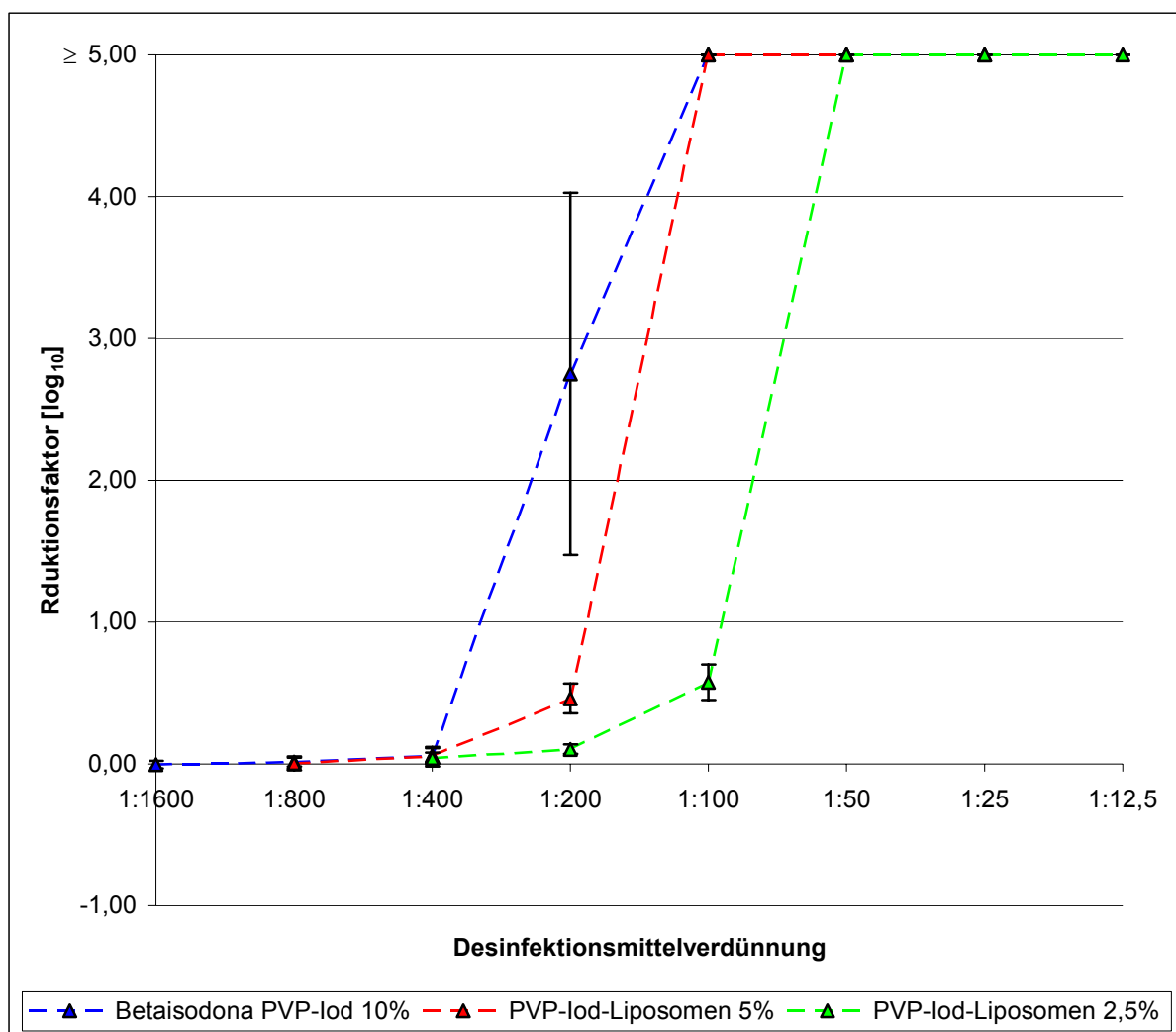
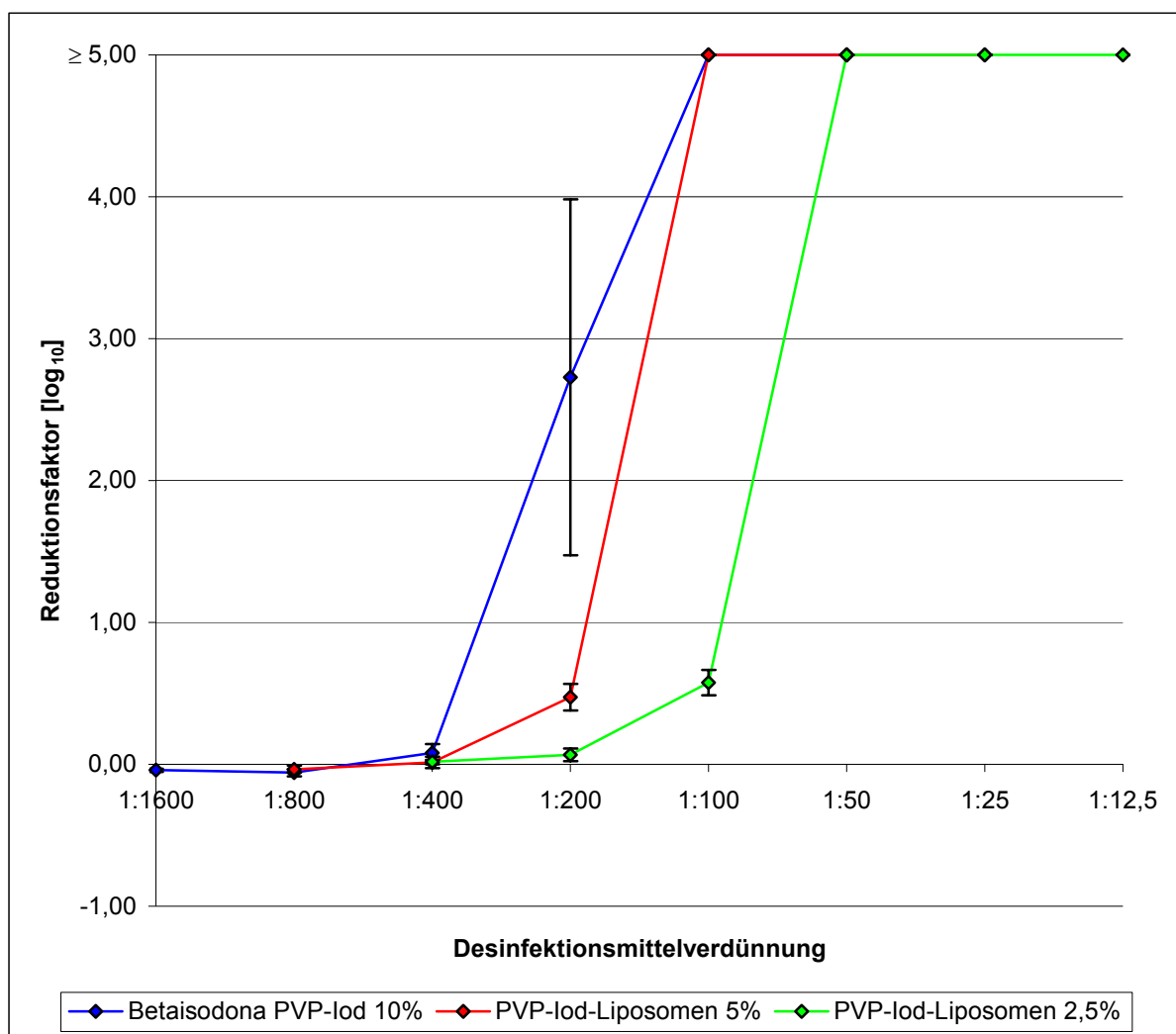


Abbildung 15: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183*
bei 5 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung



5.1.4 Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* mit 10% FKS-Belastung

Abbildung 16: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* bei 0,5 min Reaktionszeit und 10% FKS-Belastung

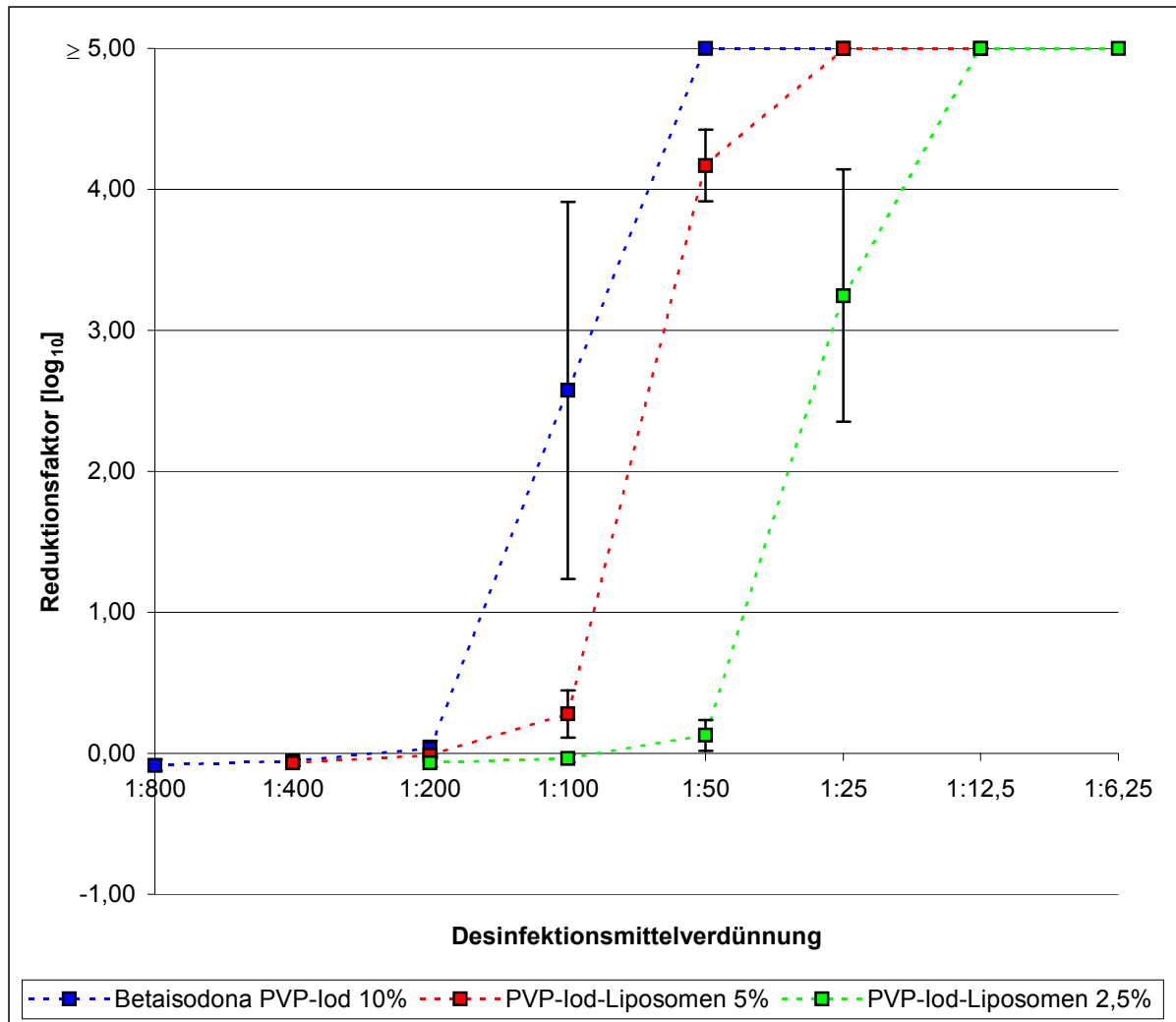


Abbildung 17: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183*
bei 1 min Reaktionszeit und 10% FKS-Belastung

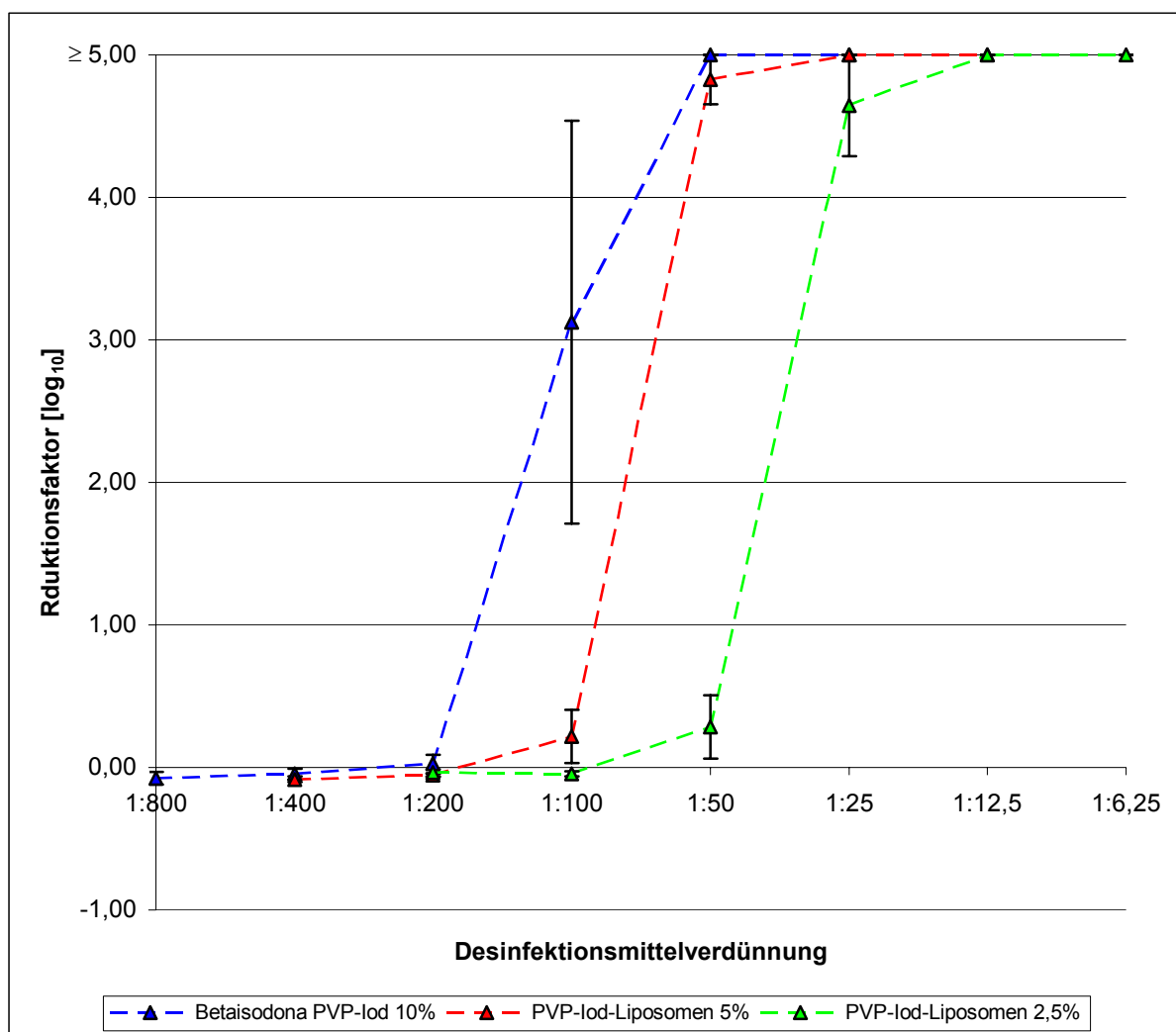
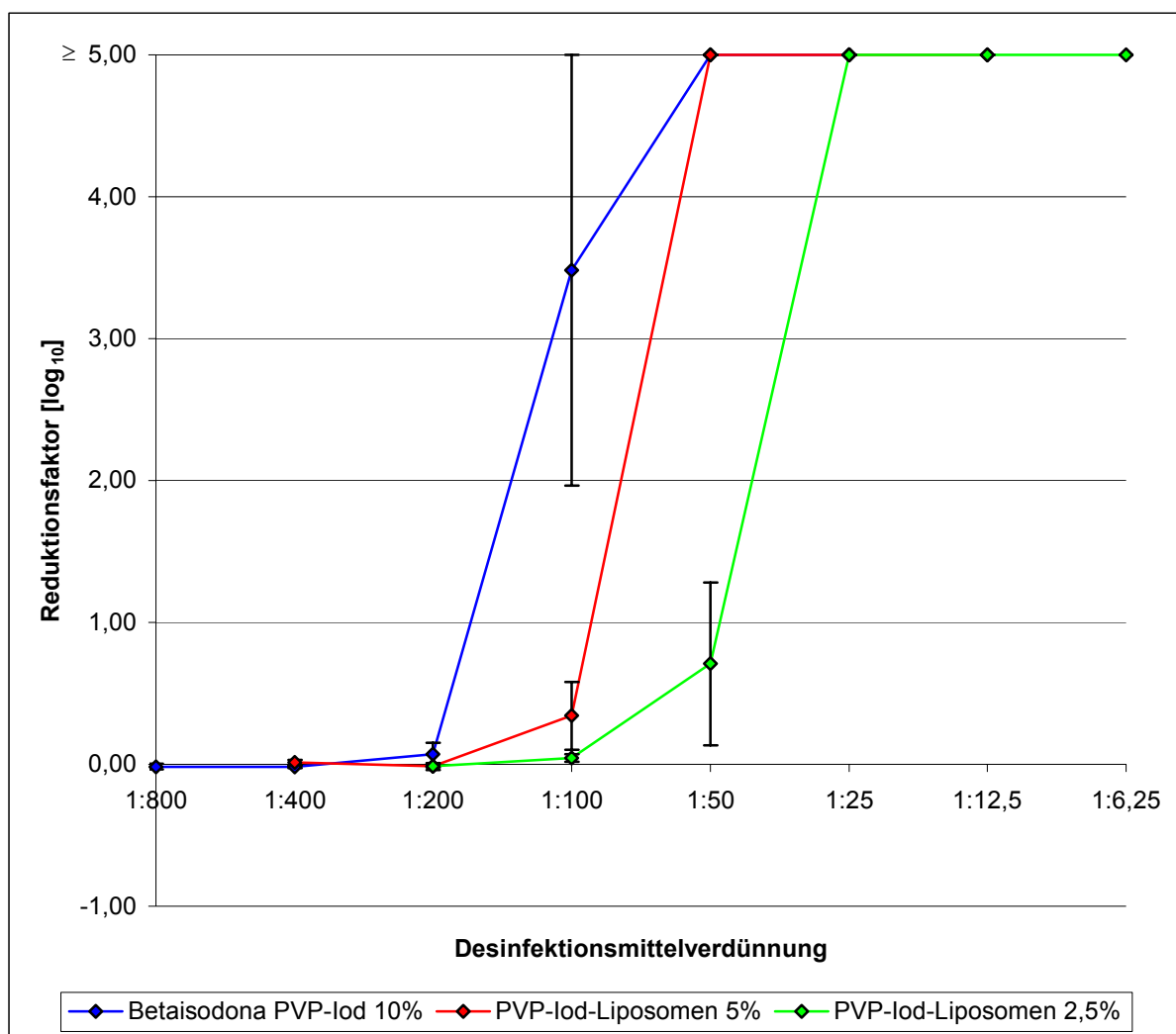
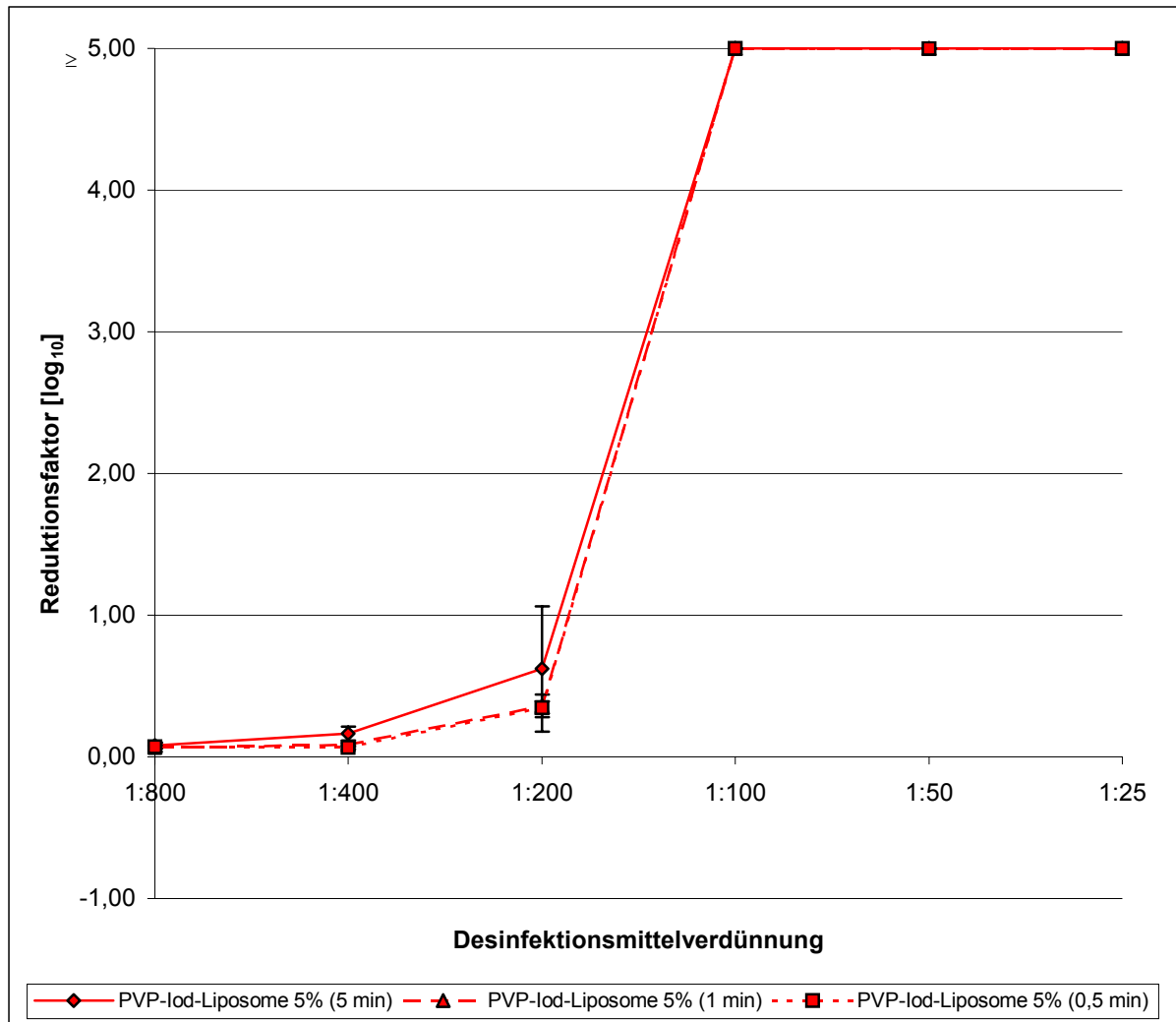


Abbildung 18: Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183*
bei 5 min Reaktionszeit und 10% FKS-Belastung



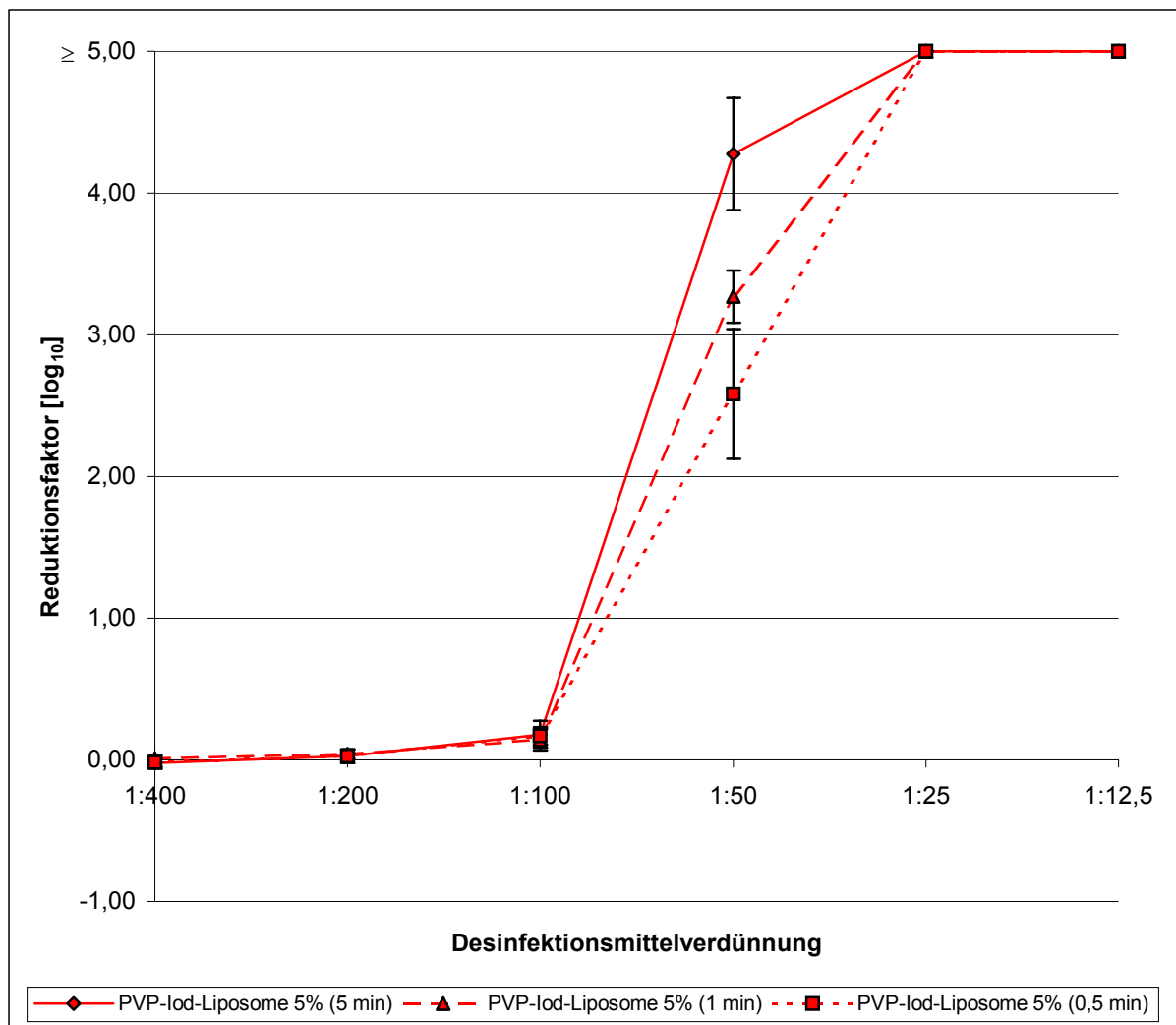
5.1.5 Wirkung von PVP-Iod-Liposomen 5% auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* ohne FKS-Belastung

Abbildung 19: Wirkung von PVP-Iod-Liposomen 5% auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* bei 0,5, 1 und 5 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung



5.1.6 Wirkung von PVP-Iod-Liposomen 5% auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* mit 10% FKS-Belastung

Abbildung 20: Wirkung von PVP-Iod-Liposomen 5% auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* bei 0,5, 1 und 5 min Reaktionszeit mit 10% FKS-Belastung



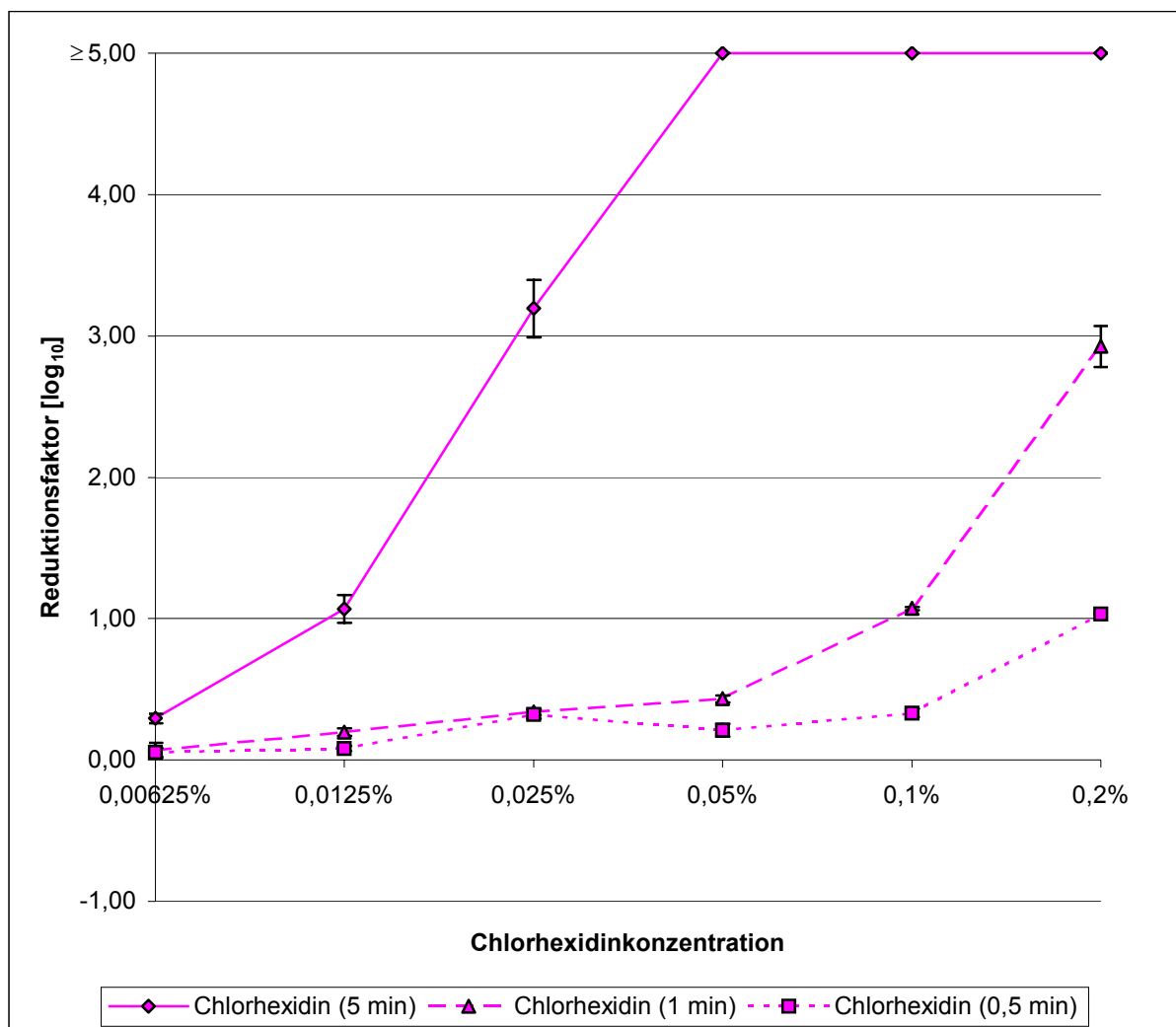
5.2 Chlorhexidin

Da bei Chlorhexidin die Wirkung sehr stark von der gewählten Einwirkungszeit abhängig ist, wurden hier alle drei Einwirkungszeiten in einem Diagramm dargestellt.

5.2 Chlorhexidin

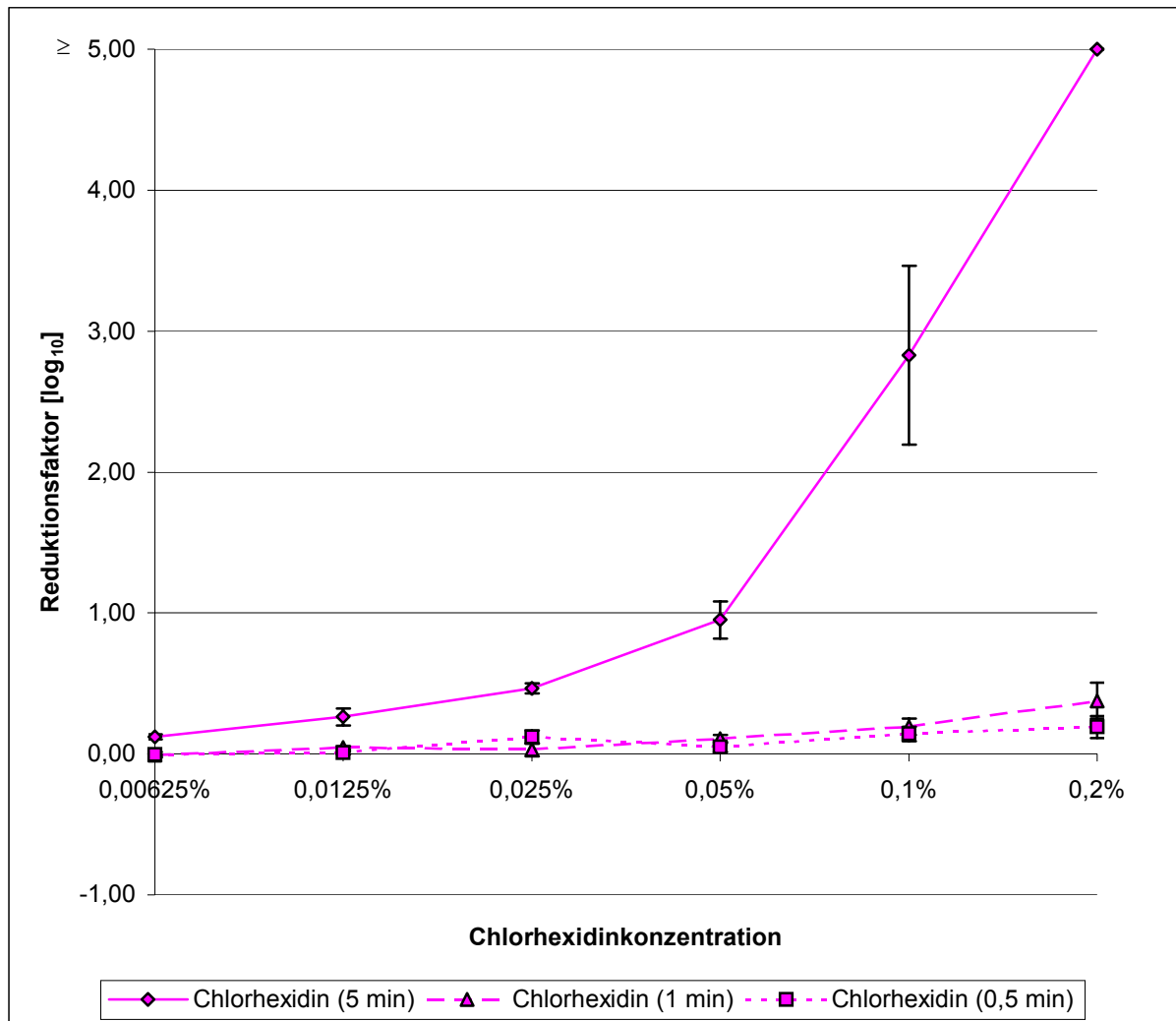
5.2.1 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. trachomatis* serovar *D* ohne FKS-Belastung

Abbildung 21: Wirkung von Chlorhexidin auf *C. trachomatis* serovar *D* bei 0,5, 1 und 5 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung



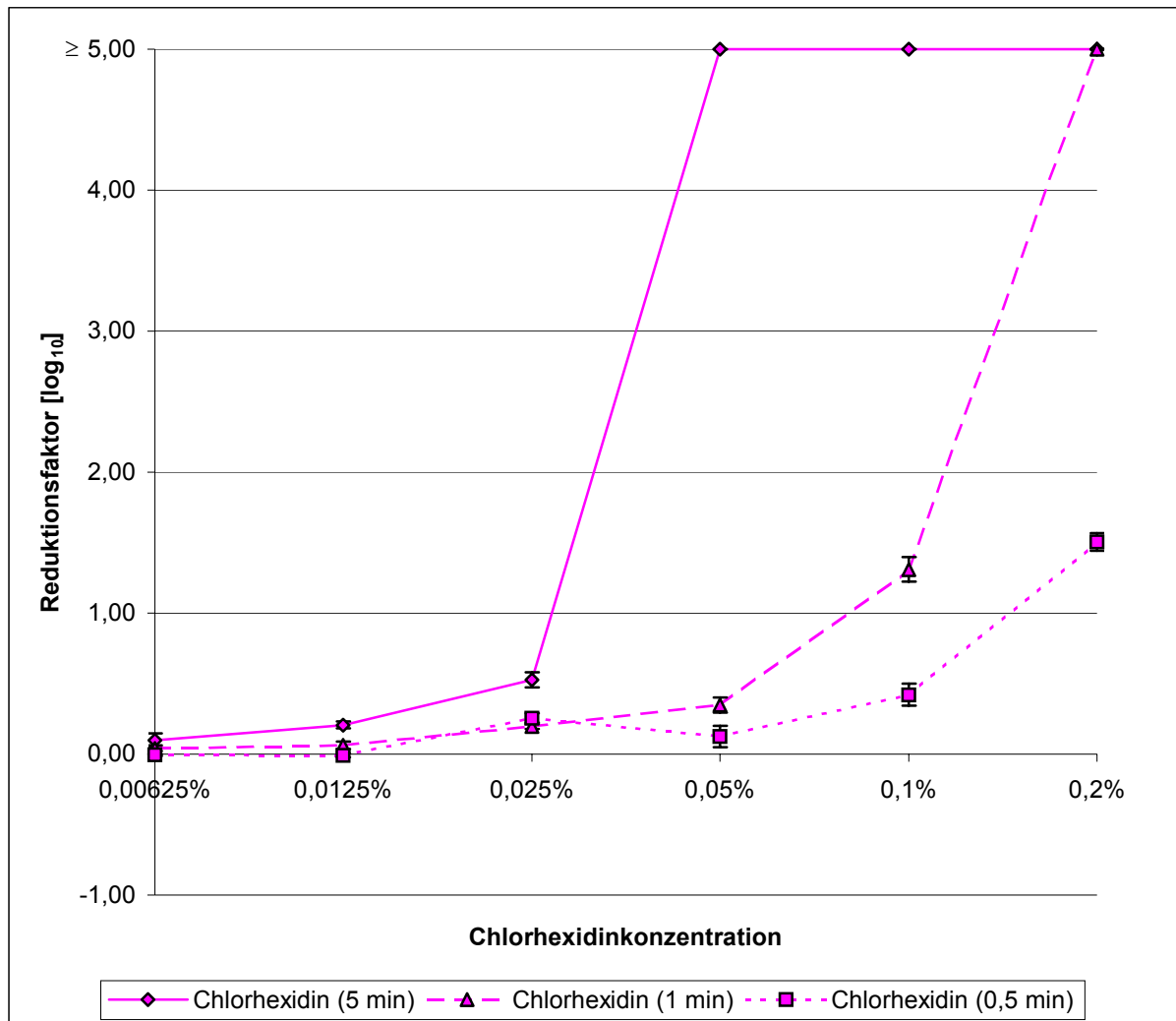
5.2.2 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. trachomatis* serovar *D* mit 10% FKS-Belastung

Abbildung 22: Wirkung von Chlorhexidin auf *C. trachomatis* serovar *D* bei 0,5, 1 und 5 min Reaktionszeit mit 10% FKS-Belastung



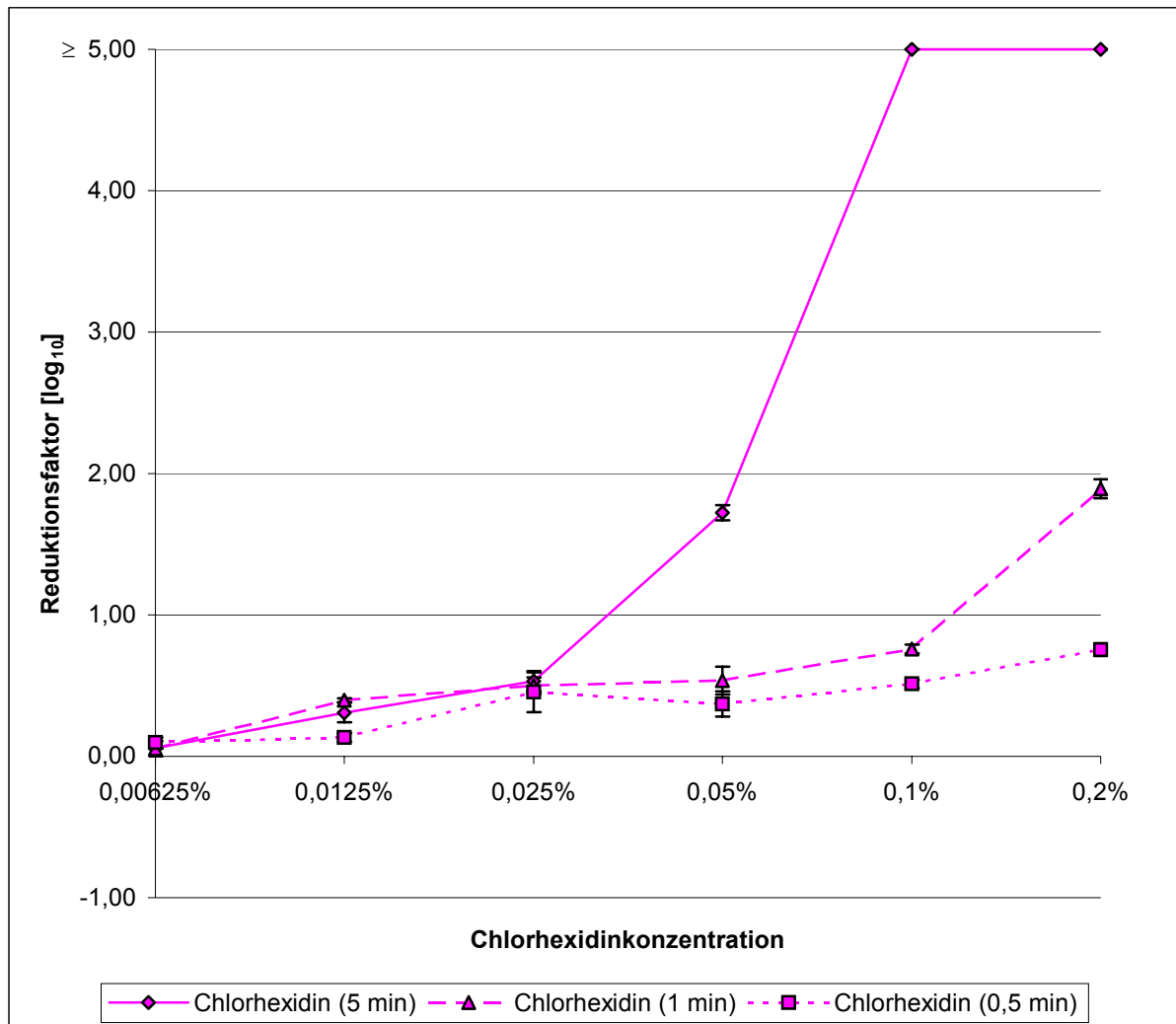
5.2.3 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* ohne FKS-Belastung

Abbildung 23: Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* bei 0,5, 1 und 5 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung



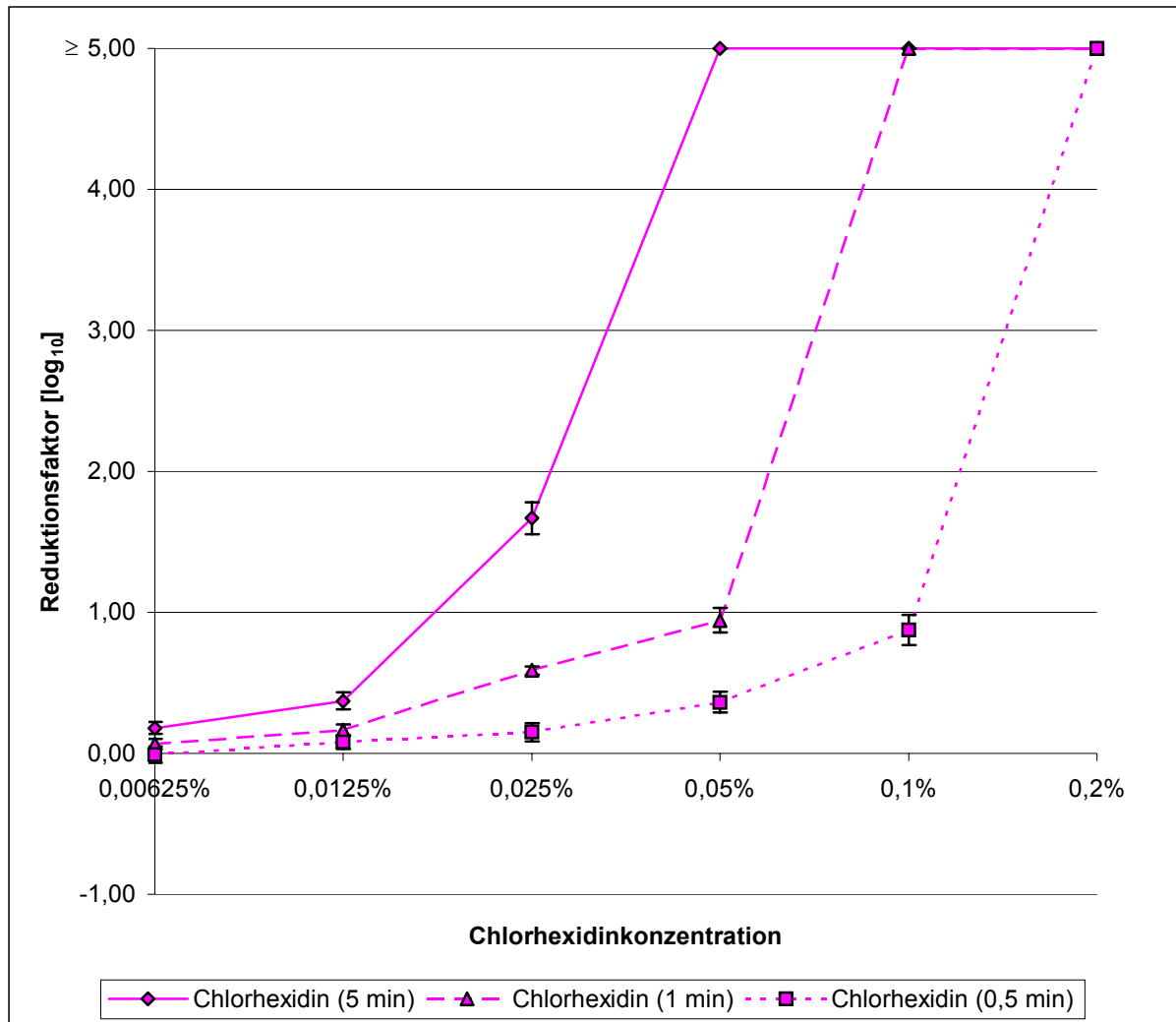
5.2.4 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* serovar *TW-143* mit 10% FKS-Belastung

Abbildung 24: Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* bei 0,5, 1 und 5 min Reaktionszeit mit 10% FKS-Belastung



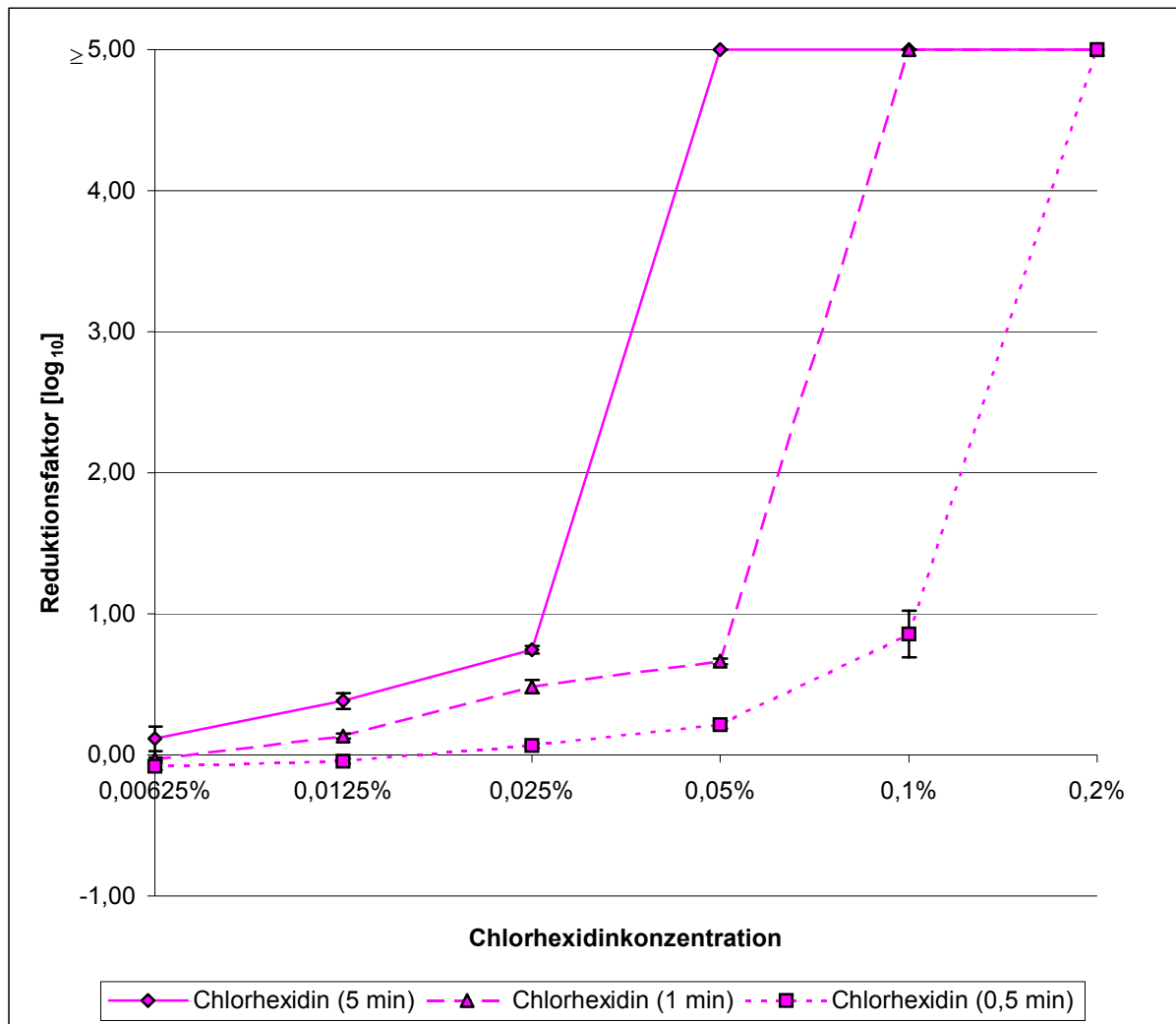
5.2.5 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* ohne FKS-
Belastung

Abbildung 25: Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* bei 0,5, 1 und 5 min Reaktionszeit ohne FKS-Belastung



5.2.6 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat HK mit 10% FKS-Belastung

Abbildung 26: Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat HK bei 0,5, 1 und 5 min Reaktionszeit mit 10% FKS-Belastung



5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Betaisodona (10%-PVP-Iod), PVP-Iod-Liposomen 2,5% und 5% sowie Chlorhexidin auf *C. trachomatis* serovar *D* und *C. pneumoniae* serovar *TW-183* getestet. Dabei betrugen die Einwirkungszeiten 5 min, 1 min und 0,5 min. Die Wirkung der Desinfektionsmittel wurde sowohl mit als auch ohne Zusatz von FKS getestet. Um nachzuprüfen, ob innerhalb derselben Spezies Unterschiede in der Empfindlichkeit auf Desinfektionsmittel bestehen, wurde die Wirkung von Chlorhexidin und PVP-Iod-Liposomen 5% auf das klinische Isolat *HK* der Spezies *C. pneumoniae* aus Jena getestet.

Ohne Eiweißbelastung konnte die Reduktion der Chlamydien um fünf \log_{10} -Stufen (desinfizierende Wirkung nach DIN EN 1040, 1997) mit folgenden Konzentrationen erreicht werden: Beim Einsatz von PVP-Iod Liposomen 2,5% gegen *C. trachomatis* serovar *D* ist eine Verdünnung von 1:50 (0,05% PVP-Iod) sowohl bei 0,5 min, 1 min als auch bei 5 min Einwirkungszeit ausreichend. Mit PVP-Iod Liposomen 5% konnte bis 1:100 (0,05%) und bei Betaisodona (10% PVP-Iod) bis 1:200 (0,05%) verdünnt werden, um bei allen Einwirkungszeiten die volle Wirkung zu erreichen. Für alle drei Ausgangsverdünnungen bestätigt sich somit, dass bei einer Konzentration von 0,05% PVP-Iod die volle Wirksamkeit erreicht wird.

Bei 10% FKS-Belastung musste in diesen Fällen genau die vierfache Konzentration von 1:12,5, 1:25 sowie 1:50 (0,2%) angewendet werden, um die Desinfektion zu erreichen. Dabei ist auffällig, dass das an Liposomen gebundene und damit für Schleimhäute besser verträgliche PVP-Iod (Wutzler, P., 2000) bei gleicher Konzentration des PVP-Iodanteils die volle Wirkung erreicht wie das in wässriger Lösung vorliegende Betaisodona. Auch bei FKS-Belastung ist zwischen Betaisodona und den PVP-Iod-Liposomen bei gleichem Iodanteil kein wesentlicher Unterschied festzustellen.

Bei der Testung der Wirksamkeit von PVP-Iod-Verbindungen auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183*, ist gegenüber der Wirksamkeit auf *C. trachomatis* serovar *D* folgendes zu bemerken: Vergleicht man die Reduktionsfaktoren (Vergleiche Tabelle 10, 11, 12 mit 16, 17, 18), so ist die Wirkung der PVP-Iod-Verbindungen auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* ohne FKS-Belastung durchweg etwas schlechter, als auf *C. trachomatis* serovar *D*. Mit FKS-Belastung ist die Wirkung auf erstere jedoch besser.

Bei beiden Spezies ist eine Reduktion um fünf \log_{10} -Stufen mit der empfohlenen Desinfektionsmittelkonzentration möglich.

Die Wirkung von PVP-Iod-Liposomen 5% auf das klinische Isolat *HK* erreicht sowohl bei einer Reaktionszeit von 0,5 min, 1 min und 5 min ohne Eiweißbelastung die volle Desinfektion noch bei einer Verdünnung von 1:100 (0,05% PVP-Iod). Mit Eiweißbelastung wird die volle Desinfektion noch bei einer Verdünnung von 1:25 (0,2 PVP-Iod) erreicht. Somit sind in diesem Fall keine Unterschiede zu *C. pneumoniae* serovar *TW-183* festzustellen.

Bei der Testung von Chlorhexidin ergab sich jedoch ein anderes Bild:

Bei Chlorhexidin ist die Wirkung sehr deutlich von der Einwirkungszeit abhängig. Betrachtet man die Wirkung von Chlorhexidin auf *C. trachomatis* serovar *D* ohne FKS-Belastung, so ist bei 5 min Einwirkungszeit die volle Wirkung bereits bei 0,05% eingetreten. Bei 1 min Einwirkungszeit ist selbst bei der höchsten getesteten Konzentration von 0,2% lediglich ein Reduktionsfaktor von 2,93 erreichbar. Bei 0,5 min beträgt der Reduktionsfaktor sogar nur 1,03 bei einer Konzentration von 0,2%.

Mit FKS Belastung ist dies unter sonst gleichen Bedingungen noch eindrucksvoller zu sehen. Während die volle Wirkung bei der höchsten Konzentration von 0,2% nach 5 min noch zu erreichen ist, beträgt der Reduktionsfaktor nach 1 min lediglich 0,38 und nach 0,5 min nur 0,19, was so gut wie keiner Wirkung entspricht. Dieselbe Tendenz ist auch bei der Wirkung auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* als auch auf das klinische Isolat *HK* festzustellen.

Im Gegensatz zu PVP-Iod erbrachte die Verwendung von Chlorhexidin sowohl Unterschiede in der Wirkung auf *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*. Aber auch innerhalb der Spezies *C. pneumoniae* zeigten sich Unterschiede zwischen dem Serovar *TW-183* und dem klinischen Isolat *HK*: Bei *C. trachomatis* serovar *D* ohne FKS-Belastung wird die volle Wirkung nach 5 min Einwirkungszeit und einer Chlorhexidinkonzentration von 0,05% erreicht. Nach 1 min beträgt der RF bei 0,2% 2,93, nach 0,5 min 1,03. Bei *C. pneumoniae* serovar *TW-183* ohne FKS-Belastung wird die volle Wirkung schon nach 1 min Einwirkungszeit und einer Chlorhexidinkonzentration von 0,02% erreicht. Nach 0,5 min Einwirkungszeit und 0,2% beträgt der RF 1,51.

Bei der Verwendung von Chlorhexidin ohne FKS-Belastung gegen das klinische Isolat *HK* setzt die volle Wirkung bereits nach 0,5 min und 0,2% ein. Nach 1 min wird nur noch eine Konzentration von 0,1% benötigt, nach 5 min nur noch 0,05%.

Sowohl PVP-Iod als auch Chlorhexidin weisen einen Eiweißfehler auf. PVP-Iod muss gegen *C. pneumoniae* serovar *TW-183* ungefähr doppelt so hoch konzentriert werden, um den Eiweißfehler auszugleichen, im Einsatz gegen *C. trachomatis* serovar *D* ist ungefähr die vierfache Konzentration für den Ausgleich nötig.

In den Fällen in denen mit den hier beschriebenen Einwirkungszeiten beim Einsatz von Chlorhexidin die volle Reduktion erreicht wird, muss die Konzentration gegen *C. pneumoniae* serovar *TW-183* ebenfalls verdoppelt und gegen *C. trachomatis* serovar *D* ebenfalls vervierfacht werden. Auffällig ist, dass Chlorhexidin bei der Einwirkung auf das klinische Isolat *HK* im Vergleich einen sehr geringen Eiweißfehler aufweisen.

In der folgenden Tabelle wird nochmals dargestellt, bei welcher Konzentration der Desinfektionsmittel nach entsprechender Einwirkungszeit eine maximale Reduktion der Chlamydien erreicht wurde ($> 5 \log_{10}$ -Sufen).

Tabelle 9: Überblick über Ergebnisse

Stamm	Desinfektions-Mittel	Eiweiß-belastung	Einwirkungszeit [min]	Desinfizierende Wirkung ^a ab ^b :
<i>C. trachomatis</i> serovar <i>D</i>	PVP-Iod-Liposomen 5%	0%	0,5	1 :100 (0,05%)
			1	1 :100 (0,05%)
			5	1 :100 (0,05%)
	PVP-Iod-Liposomen 2,5%		0,5	1 :50 (0,05%)
			1	1 :50 (0,05%)
			5	1 :50 (0,05%)
	Betaisodona (10% PVP-Iod)		0,5	1 :200 (0,05%)
			1	1 :200 (0,05%)
			5	1 : 200 (0,05%)
	PVP-Iod-Liposomen 5%	10%	0,5	1 :25 (0,2%)
			1	1 :25 (0,2%)
			5	1 :25 (0,2%)
	PVP-Iod-Liposomen 2,5%		0,5	1 :12,5 (0,2%)
			1	1 :12,5 (0,2%)
			5	1 :12,5 (0,2%)
	Betaisodona (10% PVP-Iod)		0,5	1 :50 (0,2%)
			1	1 :50 (0,2%)
			5	1 :50 (0,2%)
<i>C. pneumoniae</i> serovar <i>TW-183</i>	PVP-Iod-Liposomen 5%	0%	0,5	1 :100 (0,05%)
			1	1 :100 (0,05%)
			5	1 :100 (0,05%)
	PVP-Iod-Liposomen 2,5%		0,5	1 :50 (0,05%)
			1	1 :50 (0,05%)
			5	1 :50 (0,05%)
	Betaisodona (10% PVP-Iod)		0,5	1 :100 (0,1%)
			1	1 :100 (0,1%)
			5	1 :100 (0,1%)
	PVP-Iod-Liposomen 5%	10%	0,5	1 :25 (0,2%)
			1	1 :25 (0,2%)
			5	1 :50 (0,1%)
	PVP-Iod-Liposomen 2,5%		0,5	1 :12,5 (0,2%)
			1	1 :12,5 (0,2%)
			5	1 :25 (0,1%)
	Betaisodona (10% PVP-Iod)		0,5	1 :50 (0,2%)
			1	1 :50 (0,2%)
			5	1 :50 (0,2%)
<i>C. pneumoniae</i> klinisches Isolat <i>HK</i>	PVP-Iod-Liposomen 5%	0%	0,5	1 :100 (0,05%)
			1	1 :100 (0,05%)
			5	1 :100 (0,05%)

		10%	0,5	1 :25 (0,2%)
			1	1 :25 (0,2%)
			5	1 :25 (0,2%)
<i>C. trachomatis</i> serovar <i>D</i>	Chlorhexidin	0%	0,5	RF=1,03 bei 0,2%
			1	RF=2,93 bei 0,2%
			5	0,05%
		10%	0,5	RF=0,19 bei 0,2%
			1	RF=0,38 bei 0,2%
			5	0,2%
<i>C. pneumoniae</i> serovar <i>TW-183</i>	Chlorhexidin	0%	0,5	RF=1,51 bei 0,2%
			1	0,2%
			5	0,05%
		10%	0,5	RF= 0,75 bei 0,2%
			1	RF= 1,89 bei 0,2%
			5	0,1%
<i>C. pneumoniae</i> klinisches Isolat <i>HK</i>	Chlorhexidin	0%	0,5	0,2%
			1	0,1%
			5	0,05%
		10%	0,5	0,2%
			1	0,1%
			5	0,05%

^a Reduktion um fünf log₁₀-Stufen

^b wird eine Reduktion um fünf log₁₀-Stufen nicht erreicht, so wird der größte erreichte Reduktionsfaktor angegeben.

Mit der angewendeten Methode kann mit den getesteten Desinfektionsmitteln eine Reduktion aller verwendeten Spezies um fünf log₁₀-Stufen erreicht werden.

Bei beiden Desinfektionsmitteln wird die Wirkung durch Eiweiß vermindert, wobei der Wirkungsverlust bei *C. trachomatis* serovar *D* durch Vervierfachung und bei *C. pneumoniae* serovar *TW-183* durch Verdopplung der Konzentration ausgeglichen werden muss.

Die Wirkung von PVP-Iod ist stärker von einer Mindestkonzentration als von der Einwirkungszeit abhängig. Chlorhexidin wirkt bereits bei geringen Konzentrationen, die Wirkung ist jedoch stark von der Einwirkungszeit abhängig.

Innerhalb derselben Spezies treten bei verschiedenen Serovaren unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Desinfektionsmittel auf.

Die für Schleimhäute besser verträgliche PVP-Iod-Liposomen (Wutzler, P., 2000) haben bei gleicher Iod-Konzentration eine gleich gute, wenn nicht gar etwas bessere Wirkung als die wässrige Lösung. Beim Einsatz gegen *C. trachomatis* serovar *D* werden unter denselben Bedingungen ausnahmslos die gleichen Iod-Konzentrationen benötigt um einen RF von 5 zu erreichen. Beim Einsatz gegen *C. pneumoniae* serovar *TW-183* wird bei 0% FKS sogar in

wässriger Lösung die doppelte Iod-Konzentration benötigt wie bei den Liposomen. Dies zeigt sich auch beim Einsatz von 10% FKS und einer Einwirkungszeit von 5 min.

Wie schon erwähnt, so ist die Wirkung von Chlorhexidin viel stärker von der Einwirkungszeit abhängig, als die von PVP-Iod. Ist bei PVP-Iod einmal eine bestimmte Konzentration erreicht, so tritt die Wirkung so schnell ein, dass bei den hier verwendeten Einwirkungszeiten kein Unterschied mehr feststellbar ist.

6. Diskussion

Betrachten wir die in dieser Arbeit angewandten und entwickelten Methode, so sind folgende Punkte festzuhalten:

Im Gegensatz zu anderen Autoren, die die Wirkung von PVP-Iod bzw. Chlorhexidin gegen Chlamydien testeten (Lampe, M. F., 1998, Lyons, J. N., 1995, Benevento, W. J., 1990, Thomas, D., 1984, Thomas, B. J., 1978, Reeve, P., 1976, , Richmond, S. J., 1975), wurde in dieser Arbeit nicht nur Serovare der Spezies *C. trachomatis* sondern auch die Spezies *C. pneumoniae* eingesetzt. Die bislang noch nicht getestete Wirkung der Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* sollte zu Überprüfung eventuell vorhandener Unterschiede dienen. Wie oben beschrieben konnten solche nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der Desinfektionsmittel auf das klinische Isolat *HK* der Spezies *C. pneumoniae* getestet. Auch hier konnten Unterschiede zu dem Laborstamm *TW-183* der selben Spezies festgestellt werden. Dazu gab es bislang noch keine Untersuchungen.

Was die verwendeten Ausgangsaliquots betrifft, so ist festzustellen, dass mit einer Ausgangskonzentration von $1,7 \times 10^9 - 3,0 \times 10^9$ IFU/ml die mindestens geforderten 5×10^8 KBE/ml (DIN EN 12353, 1996) in der vorliegenden Arbeit eingehalten bzw. weit überschritten werden. Somit konnte auch der geforderte Titer von $1,5 - 5 \times 10^8$ für die Bakterienprüfsuspension eingehalten werden (DIN EN 1040, 1997). Er lag in dieser Arbeit bei 2×10^8 für die Versuche mit PVP-Iod und bei 5×10^8 für die Versuche mit Chlorhexidin. In bisher vorgelegten Arbeiten wurden dagegen Bakterienprüfsuspensionen von 5×10^4 IFU/ml (Benevento, W. J., 1990), 1×10^6 IFU/ml (Lampe, M. F., 1998), 5×10^7 IFU/ml (Lyons, J. N., 1995), $1,5-2 \times 10^2$ IFU/ml (Thomas, D., 1984) und 5×10^4 IFU/ml (Richmond, S. J., 1975) verwendet. Dabei ist zu beachten, dass unterschiedliche Ausgangsinokula zu Veränderungen der Desinfektionsmittelwirkung führen können. Es konnte gezeigt werden, dass bei höher konzentrierten Ausgangsinokula die Desinfektionsmittelwirkung stark vermindert wurde und somit in Suspensionstests unterschiedliche Ergebnisse auftreten können (Johnston, M. D., 2000).

Die eigentliche Desinfektionsmittelreaktion wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Diese wurden lediglich in einer der bisher vorgelegten Arbeiten verwendet (Lampe, M. F., 1998). Dies hat den Vorteil, dass während eines Versuchsdurchlaufes bis zu drei Desinfektionsmittel in sechs verschiedenen Verdünnungen mit drei Einwirkungszeiten gleichzeitig getestet werden können. Wird nur ein Desinfektionsmittel getestet, so können drei Versuchsansätze zur Bestimmung eines Mittelwertes gleichzeitig ablaufen. Dies führt zu einer nicht

unwesentlichen Zeitersparnis. Gleichzeitig wurde in der Versuchsanordnung darauf Wert gelegt, immer zwei Kontrollen mitzuführen. Die erste Kontrolle (Vorwert 1) dient zur Überprüfung der Keimreduktion durch den Versuchsablauf. Dabei können das zu frühe Auftauen des Ausgangsaliquots bzw. Verzögerungen im Versuchsablauf eine Rolle spielen. Die zweite Kontrolle (Vorwert 2) dient der Überprüfung der Restdesinfektionsmittelwirkung nach Beendigung der eigentlichen Desinfektionsmittelreaktion durch Verdünnung. Ebenso kann durch diese Kontrolle überprüft werden, ob es durch die Restdesinfektionsmittelwirkung nach Ausverdünnung zu einer möglichen Schädigung des Wirtszellrasen kommt (Wergen, M., 1986). Es wurde dabei darauf geachtet für die Reaktion und die Verdünnung Mikrotiterplatten mit U-Boden-Näpfen zu verwenden. Dies dient der Optimierung der Durchmischung während des zeitlich begrenzten Mischvorganges mit der elektronischen Pipette. Bei der Testung von Chlorhexidin, wurde in der vorliegenden Arbeit speziell darauf geachtet, dass der Versuch auch bei Verwendung von Chlorhexidin in PBS abläuft. Da sich Chlorhexidin lediglich bis zu einer Konzentration von 0,05% dauerhaft bzw. von 0,25% für kurze Zeit in PBS lösen lässt (Weiss, H., 1986) ist die beschriebene Vorbereitungsreihenfolge genau einzuhalten, um die Ausfällung zu verhindern. In anderen Arbeiten wurde dagegen steriles destilliertes Wasser zur Verdünnung des Chlorhexidins verwendet (Richmond, S. J., 1975). Dies kann aufgrund der pH-Wert-Schwankungen und des Unterschiedes des osmotischen Druckes bereits schon zu Inaktivierung der Bakterien führen. Bei der Auswahl der getesteten Chlorhexidinkonzentrationen wurde speziell auf die praxisrelevanten Dosierungen Wert gelegt. Es wurden dabei die Chlorhexidinkonzentrationen in Fertigprodukten berücksichtigt (Rote Liste 2002).

Zur Beendigung der Desinfektionsmittelwirkung wurde das Verdünnungs-Neutralisationsverfahren als Mittel der Wahl verwendet (DIN EN 1040, 1997). Als Verdünnungslösung (VL) wurde PBS mit 2% FKS verwendet. Dieses Verfahren ist der Beendigung der Desinfektionsmittelwirkung mit chemischen Neutralisierungsmitteln (Enthemmern) wie Tween 80, Lubrol, Lecithin, L-Cystein, Natriumthiosulfat, Natriumsulfit oder Natriumthioglycolat vorzuziehen, da diese selbst durch Ihre Cytotoxizität zur Schädigung des Wirtszellrasen und damit zur Verfälschung des Ergebnisses führen (Roesger, M. 1984). Bei dem in dieser Arbeit angewendetem Verfahren kommt es während des Verdünnungsvorganges zu einer Ausverdünnung um den Faktor 10000. Da die Verdünnung jedoch in vier Schritten mit dem Faktor 10 vorgenommen wird, kann es in den ersten Verdünnungsstufen (siehe Abbildung 4) noch zu Restwirkungen der Desinfektionsmittel kommen. Deshalb wurde unbedingt auf ein zügiges und reibungsloses Arbeiten geachtet. Um

eine optimale Verdünnung zu gewährleisten, wurde darauf Wert gelegt, dass nach jeder Verdünnungsstufe erneut im Mischmodus der elektronischen Pipette gründlich gemischt wurde. Bei Versuchsdurchführung gehört etwas Übung dazu, den Start der Desinfektionsmittelreaktion und die Beendigung der Desinfektionsmittelwirkung durch Ausverdünnung im entsprechenden Zeitrahmen vorzunehmen. Es ist nötig, bei der verwendeten elektronischen Pipette vom Typ Eppendorf Response/Multi-channel nach der Übertragung der Desinfektionsmittelverdünnungsreihe auf die vorbereiteten Chlamydien das Pipettivolumen und den Pipettiermodus auf Mischmodus umzustellen, was während der 30s Reaktionszeit schnell vor sich gehen muss. Eine Möglichkeit, dieser Problematik zu entgehen, wäre die Verwendung eines Pipettierautomaten.

Bei der Auswahl der Pipetten ist auf größtmögliche Genauigkeit zu achten, da schon kleinste Volumendifferenzen zu größeren Abweichungen des Ergebnisses führen können. So tritt bei der verwendeten Pipette laut Hersteller bei der 10µl-Einstellung ein systematischer Fehler und zufälliger Fehler von je $\pm 2\%$ auf. Bei der 100µl-Einstellung beträgt der systematische Fehler 0,8%, der zufällige 2,5%. Es ist bei der schnellen Arbeitsweise unbedingt darauf zu achten, dass die Pipettenspitzen mit den Pipettenkonen dicht abschließen, was bei diesem Pipettentyp durch die vorhandenen Gummidichtungen an den Arbeitskonen gut gewährleistet ist. Ebenfalls wichtig ist, dass die zu pipettierenden Volumina in einem Vorgang pipettiert werden, da sich sonst noch größere Fehler ergeben.

Im Rahmen der Kultivierung ist bei der Vorbereitung des Zellmonolayers streng darauf zu achten, dass pro Mikrotiternapf stets gleich viele Zellen eingesät werden. Vor Übertragung der Chlamydien suspension wurde der Zellrasen mikroskopisch auf Vitalität und Zelldichte überprüft. Dies ist mit großer Sorgfalt durchzuführen, da eine Abweichung der Wirtszellzahl oder deren Avitalität zu einer erheblichen Abweichung der gebildeten Einschlusskörperchen führt. Was den Nachweis der nach Desinfektion vitalen und infektiösen Elementarkörperchen betrifft, so wurden die nach Inkubation entstandenen Einschlusskörperchen im Falle von *C. pneumoniae* mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper gegen LPS und im Falle von *C. trachomatis* gegen MOMP angefärbt. Zur besseren Kontrastierung gegenüber dem Zellrasen wurde etwas Evansblue zugegeben. Diese Kombination führt im Gegensatz zu der in einer anderen Arbeit verwendeten May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Thomas, D., 1984) zur besseren Kontrastierung und dadurch zur leichteren und genaueren Auswertung.

Die Versuchsauswertung wurde mit der Auswertung von 10 Gesichtsfeldern bzw. Zählquadraten pro Napf vorgenommen. Im Gegensatz zu z. B. drei Wiederholungszählungen in anderen Arbeiten (Lampe, M. F., 1998) konnte die Genauigkeit erhöht werden. Darüber

hinaus wurde nicht nur die letzte Verdünnungsstufe des Verdünnungsschemas (siehe Abb.: 4) ausgewertet, sondern jede Verdünnungsstufe (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) einzeln, um daraus wiederum den Mittelwert zu bilden. Jeder einzelne Versuchsansatz wurde zusätzlich noch dreimal wiederholt, was ebenfalls zur Genauigkeit beiträgt. Durch die Bestimmung des Standardfehlers aus diesen drei Versuchen kann eine Aussage über die Streubreite der Versuchsergebnisse getroffen werden. Diese ist wie oben beschrieben gerade bei PVP-Iod im Übergangsbereich von keiner zur vollen Wirkung im Gegensatz zu Chlorhexidin relativ groß. Bei der Auszählung der Einschlusskörperchen unter dem Fluoreszenzmikroskop ist unbedingt zu berücksichtigen, dass die bereits geplatzen Einschlusskörperchen mitgezählt werden. Während der Auszählung sollten regelmäßig Pausen eingelegt werden, da es durch Ermüdungserscheinungen leicht zu Zählfehlern kommen kann. Einschlusskörperchen, die auf der Grenze des Zählquadrates oder des Gesichtsfelds, liegen müssen zur Hälfte mitgezählt werden.

Durch die Berechnung des Reduktionsfaktors kann eine klare und eindeutige Aussage über die tatsächliche Reduktionsrate des Desinfektionsmittels getroffen werden. Wird das Ergebnis der Keimreduktion im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit in Prozent ausgedrückt (Lampe, M. F., 1998, Lyons, J. N., 1995, Benevento, W. J., 1990, Thomas, D., 1984, Richmond, S. J., 1975), so ist keine definitive Aussage über die Desinfektionsfähigkeit einer Substanz möglich, da diese nur bei einem Nachweis einer Titerreduktion von 5 \log_{10} -Stufen gegeben ist (DIN EN 1040). Noch unspezifischer ist die Auswertung, wenn die Wirkung des Desinfektionsmittels in der Verlängerung der Lebensdauer eines infizierten Hühnerembryos in Abhängigkeit der Desinfektionsmittelverdünnung ausgedrückt wird (Thomas, B. J., 1978, Reeve, P., 1976).

Zur weiteren Standardisierung der Versuchsdurchführung wurde ein genaues Schema festgelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Reihenfolge der durchgeführten Schritte zur Fehlerreduktion beiträgt. Alle zeitabhängigen Schritte wie z. B. die kurzfristige Herstellung der Chlorhexidinverdünnungen zur Vermeidung der Ausfällung und das möglichst späte Auftauen des Chlamydienaliquots zur Vermeidung der Titerreduktion wurden optimal in den Versuchsablauf eingebettet. Gerade im Falle eines zu früh aufgetauten Chlamydienaliquots kann es während länger auftretenden Pausen zu nicht vernachlässigbaren Titerreduktionen kommen (Schneider, W., 1986). Alle Vorbereitungen zum störungsfreien Ablauf der Desinfektionsreaktion und Ausverdünnung nach den vorgeschriebenen Reaktionszeiten wurden vorgezogen (siehe 4.10).

Das Ziel dieser Arbeit ist der Entwurf einer Methode zur Testung der Wirkung von Desinfektionsmitteln gegen Chlamydien im Suspensionsversuch. Eine in vivo Testung der Desinfektionsmittel kann hier nicht berücksichtigt werden. Es wurde lediglich versucht, durch die Bestimmung des Eiweißfehlers, eine Aussage über die Abschwächung der Desinfektionsmittelwirkung durch organische Substanzen zu treffen. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die bereits vorhandenen Arbeiten, so ist festzustellen, dass eine Untersuchung der Desinfektionsmittelwirkung gegen *C. pneumoniae* bis jetzt nicht veröffentlicht wurde und somit keine Vergleichsmöglichkeit vorliegt.

Im Bezug auf *C. trachomatis* gibt es mehrere Arbeiten. Im Vergleich dieser mit der hier beschriebenen Methode ist folgendes festzustellen:

Bereits 1976 wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der die Wirkung von PVP-Iod gegen *C. trachomatis* getestet wurde (Reeve, P., 1976). In dieser Arbeit wurde eine Chlamydien suspension 15 min verschiedenen PVP-Iod-Konzentrationen ohne Proteinbelastung ausgesetzt und dann in bebrütete Hühnereier injiziert. Die Wirkung des Desinfektionsmittels wurde dabei als Verlängerung der Lebenszeit des Hühnerembryos in Abhängigkeit von der Desinfektionsmittelkonzentration dargestellt. Eine ausreichende Wirkung von PVP-Iod konnte bis zu einer Verdünnung von 0,25% festgestellt werden, was sich durch Überleben und Ausschlüpfen des Hühnerembryos äußerte.

1978 wurde eine Arbeit veröffentlicht, die mit derselben Methode unter gleichen Bedingungen zu demselben Ergebnis kam (Thomas, B. J., 1978).

1984 wurde PVP-Iod erstmals geprüft, indem die Zahl der Chlamydien des Stammes *C. trachomatis* serovar *D* in der Zellkultur bestimmt wurde (Thomas, D., 1984). Bei Einwirkungszeiten von 5 min, 30 min und 120 min konnte mit einer getesteten Konzentration von 0,05% PVP-Iod ohne Eiweißbelastung keine Wirkung festgestellt werden, was sich durch eine Reduktion der Einschlusskörperchen von 22% (RF=0,11) nach 5 min, von 37 % (RF=0,43) nach 30 min und gar einer Zunahme der Einschlusskörperchen von 11% (RF= - 0,05) nach 120 min äußerte.

Erst 1990 konnte bei einer erneuten Testung der Wirkung von PVP-Iod gegen *C. trachomatis* mit der Hilfe von Zellkulturen eine Wirkung nachgewiesen werden (Benevento, W. J., 1990). Bei 10%iger Eiweißbelastung konnte nach 1 min Einwirkungszeit mit einer 0,1%igen PVP-Iod-Lösung eine Reduktion von 99,5% aufgezeigt werden, was einem RF von 2,3 entspricht. Dieses Ergebnis ist mit dem von P. Reeve und B. J. Thomas (0,25%) in Einklang zu bringen, wenn man voraussetzt, dass es bei PVP-Iod weniger auf die Einwirkungszeit ankommt, als vielmehr auf das Erreichen einer bestimmten notwendigen Konzentration, damit eine

Wirkung erzielt werden kann. Dies konnte mit der in dieser Arbeit aufgezeigten Methode ebenfalls bestätigt werden.

Die hier beschriebene Methode zeigte bei allen drei Einwirkungszeiten und 10% Eiweißbelastung die komplette Reduktion ($RF=5$) bei einer PVP-Konzentration von 0,2%. Bei den Werten von W. J. Benevento (10% FKS, 1 min, 0,1%, $RF=2,3$) wurde mit der hier beschriebenen Methode ein RF von 0,75 erreicht, der allerdings mit einem bestimmten Standardfehler von 0,41 einer nicht unerheblichen Streuung unterliegt. Außerdem wurden die Versuche von W. J. Benevento mit einem klinischen Isolat durchgeführt, was wie auch in dieser Arbeit gezeigt, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

D. Thomas scheint mit seiner verwendeten Konzentration von 0,05% ohne Eiweißbelastung den Wirkungsbereich noch nicht erreicht zu haben, obwohl sich das durch unsere Methode nicht bestätigte:

Ohne Eiweißbelastung konnte die volle Wirkung ($RF=5$) von PVP-Iod in wässriger Lösung (Betaisodona® 10%) mit einer Konzentration von 0,05% sowohl bei 0,5 min, 1 min und 5 min erreicht werden.

Beachtet man jedoch die Tatsache, dass mit derselben Methode unter den gleichen Bedingungen bereits bei der Hälfte der Konzentration von 0,025% PVP-Iod in wässriger Lösung so gut wie keine Wirkung (0,5 min: $RF=0,14$, 1 min: $RF=0,11$, 5 min: $RF=0,14$) nachgewiesen werden konnte, so relativiert sich der Unterschied zu den Ergebnissen von D. Thomas.

In Anbetracht der Ergebnisse, die bisher bei der Testung von Chlorhexidin gegen

C. trachomatis veröffentlicht wurden ist folgendes zu sagen:

Bereits 1975 wurde die Wirkung von Chlorhexidin gegen *C. trachomatis* serovar E getestet (Richmond, S. J., 1975). Ohne Eiweißbelastung konnte er bereits bei einer Konzentration von 0,00225% und 20 min Einwirkungszeit eine Reduktion von 99,96% nachweisen ($RF=3,4$).

Vier Jahre später zeigte bereits die Testung einer 0,001%igen Chlorhexidinverdünnung gegen *C. trachomatis* bei 5 min, 10 min, 20 min und 40 min Einwirkungszeit ohne Eiweißzusatz, dass die Wirkung bei Chlorhexidin im Gegensatz zu PVP-Iod wesentlich von der Einwirkungszeit abhängt (Nisbet, I. T., 1979). Bei 5 min Einwirkzeit wurde eine Reduktion um 71% ($RF=0,54$), bei 10 min um 81% ($RF=1,23$), bei 20 min um 88,5% ($RF=0,94$) und bei 40 min um 94% ($RF=1,22$) festgestellt.

1984 wurde eine 0,02%ige Chlorhexidinlösung gegen *C. trachomatis* getestet (Thomas, D., 1984). Ohne Eiweißbelastung konnte nach 5 min eine 97%ige ($RF=1,52$), nach 30 min und 120 min eine 100%ige Reduktion registriert werden. Da keine Angaben über die Anzahl der

tatsächlich desinfizierten Elementarkörperchen gemacht wurden, kann kein Reduktionsfaktor angegeben werden.

1995 testete J. M. Lyons erneut die Wirkung von Chlorhexidin gegen *C. trachomatis* (Lyons, J. M., 1995). Dabei konnte er ohne Eiweißbelastung mit 0,04% Chlorhexidin nach 15 min und mit 0,004% Chlorhexidin nach 60 min eine Reduktion >99% nachweisen (RF > 2).

Lampe untersuchte 1998 die Wirkung von Chlorhexidin sowohl auf *C. trachomatis* serovar F als auch auf serovar D (Lampe, M. F., 1998). Ohne Eiweißbelastung konnte bereits unmittelbar nach Reaktionsbeginn (0 min) mit einer Chlorhexidinkonzentration von 0,0625% eine 100%ige Verminderung erreicht werden (RF=4 bei angegebener Nachweisgrenze einer Reduktion von 4 log-Stufen).

Nach 120 min reichten unter den selben Bedingungen 0,0156% Chlorhexidin für die vollständige Inaktivierung der Chlamydien aus.

Im Unterschied dazu reichte bei *C. trachomatis* serovar F zur 100%igen Verminderung (RF=4) unmittelbar nach Reaktionsbeginn (0 min) eine 0,0313%ige Chlorhexidinkonzentration sowie nach 120 min 0,0078% Chlorhexidin.

Dies zeigt, wie auch in der vorliegenden Arbeit, dass innerhalb derselben Spezies unterschiedliche Wirkungen der Desinfektionsmittel aufzutreten scheinen.

Im Unterschied zu den sehr niedrigen Konzentrationen, die Lampe für das Erreichen von RF=4 benötigte, lagen die Konzentrationen, die mit der hier beschriebenen Methode bestimmt wurden, deutlich höher. So konnte bei der höchsten getesteten Konzentration von 0,2% nach 0,5 min lediglich ein RF von 1,03 sowie nach 1 min von 2,93 erreicht werden. Nach 5 min wurde bereits mit einer Chlorhexidinkonzentration von 0,05% ein RF von 5 erreicht.

In allen Arbeiten konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die Chlorhexidinwirkung deutlich von der Einwirkungszeit abhängig ist. Das wird auch dadurch ersichtlich, dass fast alle Autoren Einwirkungszeiten zwischen 5 min und 120 min wählten. Mit den für Chlorhexidin relativ kurz gewählten Einwirkungszeiten von 0,5 min, 1 min und 5 min, konnten trotz hoher eingesetzter Konzentrationen nur geringe Wirkungen erzielt werden.

Der Unterschied zwischen PVP-Iod und Chlorhexidin bezüglich der benötigten Einwirkungszeiten ist eventuell durch die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der beiden Desinfektionsmittel zu erklären. Durch Chlorhexidin kommt es zuerst zur Schädigung der äußeren Zellwand (El-Moug, T. 1985). Nach Durchquerung der äußeren Zellwand durch passive Diffusion kommt es nachträglich zur Zerstörung der zytoplasmatischen, inneren Membran. Daraufhin folgt die Leckage der intrazellulären Bestandteile, wobei die Leckage nicht Ursache, sondern Folge des Zelltodes ist (Russell, A. D., 1988). Bei hohen

Chlorhexidinkonzentrationen kommt es dabei zur Gerinnung der intrazellulären Bestandteile, so dass das Ausmaß der Leckage mit der Zunahme der Chlorhexidinkonzentration zuerst zunimmt, um dann nach Erreichen einer bestimmten Konzentration aufgrund der Zytosolgerinnung wieder abzunehmen. Als eigentlicher Grund der letalen Wirkung des Chlorhexidins wird das Zusammenbrechen der Membranpotentiale angesehen (Barett-Bee, K., 1994, Kuyyakanond, T., 1992).

Im Gegensatz dazu dringt Iod direkt in die Mikroorganismen ein (Chang, S. L., 1971) und greift an Schlüsselgruppen von Proteinen an. Dazu gehören die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin (Gottardi, W., 1991, Kruse, W. C., 1970). Außerdem kommt es zum Angriff an Nukleotiden und Fettsäuren (Apostolov, K. 1980, Gottardi, W., 1991). Diese Mechanismen gipfeln dann schließlich im Zelltod (Gottardi, W., 1991).

Die Bedeutung der Verwendung von Desinfektionsmitteln gegen Chlamydien hängt zum einen von der Epidemiologie der Chlamydieninfektionen, zum anderen von der praktischen Anwendbarkeit des Desinfektionsverfahrens im Einzelfall ab.

Durch epidemiologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 50% der Erwachsenen in Ländern wie den Vereinigten Staaten, Japan (Kanamoto, Y., 1991), Ungarn (Marton, A., 1992) und Spanien (Montes, M., 1992) Antikörper gegen *C. pneumoniae* aufweisen. Das bedeutet, dass bei 50% der untersuchten Personen in der Vergangenheit oder aktuell eine Infektion bestand bzw. besteht. Eine weltweite Verbreitung unterschiedlichen Ausmaßes wurde aufgezeigt. (Forsey, T., 1986). Die Prävalenz ist in den Tropen und weniger entwickelten Ländern höher als in nördlichen Ländern (Wang, S.-P., 1990). Dabei ist festzustellen, dass die Erstinfektion meistens im Schulalter auftritt (Grayston, J. T., 1986). Da die Seroprävalenz jedoch bis ins hohe Alter ansteigt, obwohl die Erstinfektion lediglich zu einer begrenzten Antikörperproduktion von drei bis fünf Jahren hervorruft, ist anzunehmen, dass es bei den meisten Personen zu Reinfektionen kommt (Patnode, D., 1990).

Betrachtet man die epidemiologischen Daten für *C. trachomatis* serovar A-C, so muss man feststellen, dass auch heute noch das Trachom für 15% aller Erblindungsfälle verantwortlich ist. Sechs Millionen Menschen sind weltweit durch das Trachom erblindet. 146 Millionen leiden unter behandlungsbedürftigen akuten Infektionen (WHO, 1996). Der Schwerpunkt der Erkrankung liegt in Ländern der Dritten Welt in Afrika und Asien. Da die Pathogenese beim Trachom eine wiederholte Infektion mit Chlamydien voraussetzt, ist die schleimhautverträgliche Desinfektion eine sinnvolle Ergänzung der Antibiotikatherapie bereits etablierter Erkrankungen.

Für *C. trachomatis* serovar *D-K* spielt der Übertragungsmechanismus über den Geschlechtsverkehr die größte Rolle. So wurden bei der Untersuchung von 431 Studentinnen bei 4,9% Chlamydien aus dem Genitalabstrich isoliert, 11,9% wiesen Antikörper im Genitalsekret auf. (McCormack, W. M., 1985). Durch *C. trachomatis* verursachte Geschlechtskrankheiten gehören sicherlich zu denen mit den höchsten Prävalenzen. Der zweite wichtige Übertragungsmechanismus ist über den Geburtskanal, was zu Neugeborenen-Konjunktivitis und Pneumonie führen kann.

Im Allgemeinen haben sich heute die unter 3.1.6 beschriebenen Behandlungsstandards durchgesetzt. Trotzdem ist festzustellen, dass Chlamydien sehr weit verbreitet sind und trotz vorhandener wirksamer Antibiotika in den Industrieländern, aber auch in Ländern der Dritten Welt, die Prävalenz der Chlamydieninfektionen sehr hoch ist.

Es stellt sich also die Frage, welche ergänzende Funktion den Desinfektionsmitteln bei der Behandlung von Infektionen durch Chlamydien zuteil werden könnte.

Voraussetzung für den Einsatz von Desinfektionsmitteln ist die lokale Begrenzung der Erkrankung, sowie die direkte oberflächliche Erreichbarkeit des Erkrankungsherd. Es ist also nötig, unter diesen Aspekten die klinischen Manifestationsmöglichkeiten von *C. pneumoniae* sowie von *C. trachomatis* zu betrachten (siehe 3.1.4.3 und 3.1.5.3).

Im Falle von *C. pneumoniae* sind Infektionen des Respirationstraktes geradezu prädestiniert für den zusätzlichen Einsatz von Desinfektionsmitteln. So werden 10% aller Pneumonien und ungefähr 5% aller Bronchitiden und Sinusitiden bei Erwachsenen diesem Erreger zugeschrieben (Grayston, J. T., 1992). Gerade in der Anfangsphase mit subakutem Beginn mit Pharyngitis und Heiserkeit könnte eventuell durch den raschen Einsatz von Desinfektionsmitteln zur Schleimhautdesinfektion der typische zweiphasige Verlauf (Grayston J. T., 1986, 1992, 1993, Thom, D. H., 1990) unterbrochen werden. Eventuell lässt sich dadurch die Entwicklung einer typischen Bronchitis oder Pneumonie verhindern.

In Adenektomiematerial konnten in 20% der Proben Chlamydien per PCR nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Dr. Oehme, Institut für Medizinische Mikrobiologie Jena).

Ein dreitägiger Anwendungsversuch von Mundsprays mit einer Kombination von Chlorhexidin, Tramazolin und Aluminiumtrilaktat an 50 Patienten mit subakuter oder akuter Pharyngitis, Tonsillitis, Pharyngotonsillitis oder Angina erbrachte folgende Ergebnisse: Die lokale Symptome wie Rötung und Schwellung des Rachens, Schluckbeschwerden, Zungenbelag sowie Lymphknotenschwellung konnte bei 34 Patienten deutlich verbessert und bei 7 verbessert werden, bei acht Patienten ergab sich keine Veränderung, ein Patient zeigte eine Verschlechterung (Klingbeil, W., 1982).

Bei *C. trachomatis* gibt es mehrere Anwendungsgebiete. So ist es sicherlich möglich, Desinfektionsmittel oberflächlich verabreicht, prophylaktisch gegen Geschlechtskrankheiten einzusetzen. So wurde nachgewiesen, dass Chlorhexidin in einem Methylzellulose-Propylenglycol-Gel gegen Infektionen schützt (Lyons, J. M., 1995).

1979 konnte gezeigt werden, dass Chlorhexidin gegen das Trachom so wirksam war wie oberflächlich angewendetes Tetracyclin oder oral verabreichtes Cotrimoxazol (Nisbet, I. T., 1997).

Die Wirkung von PVP-Iod in Form von wässriger Lösung und gebunden als Liposomen konnte nicht nur in vitro nachgewiesen werden (Wutzler, P. 2000). 1995 wurde in einer Studie mit 3117 Neugeborenen aus Kenia gezeigt, dass PVP-Iod in vivo als Prophylaxe gegen die Neugeboreneneneinschlusskonjunktivitis effektiver ist als Silbernitrat oder Erythromycin. So trat bei der einmaligen prophylaktischen Gabe von Polyvidon-Iod noch in 13,1%, von Silbernitrat in 17,5% und von Erythromycin in 15,2% der Fälle eine Neugeborenenkonjunktivitis auf. Überlegenheit zeigte sich insbesondere gegenüber *C. trachomatis* (Isenberg, S. J., 1995).

Des Weiteren ist eine gute Verträglichkeit zu fordern. So ist gerade Chlorhexidin sehr gut verträglich. Reizungen wurden zwar beschrieben, dürften aber weitgehend produktspezifisch sein (Gardner, J. F., 1991, Rosenberg, A., 1976).

Bei längerer Anwendung ist eine eventuelle Resistenzentwicklung von Chlamydien gegenüber eingesetzten Desinfektionsmitteln zu berücksichtigen, wie dies vom Einsatz von Antibiotika gegenüber Bakterien bekannt ist. Obwohl dies speziell für Chlamydien noch nicht nachgeprüft wurde, so konnte gezeigt werden, dass auch bei Langzeitanwendung von PVP-Iod gegen koagulase-negative Staphylokokken, die von der Katheteröffnung von Patienten mit Peritonealdialyse isoliert wurden, keine Resistenzen gegenüber PVP-Iod entwickelt wurden (Lanker Klossner B., 1997). Die mögliche Gewöhnung an PVP-Iod wurde außerdem mit zwei *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen, zwei *Escherichia coli*-Stämmen und zwei *Klebsiella aerogenes*-Stämmen sowie einem *Serratia marcescens*-Stamm getestet. Nach mehreren Passagen mit subinhibitorischen Konzentrationen konnte keine signifikante Änderung der minimal bakterizid wirkenden Konzentration sowie der nötigen Einwirkungszeiten festgestellt werden (Houang, E. T., 1976). Es wurde jedoch festgestellt, dass klinische Isolate gramnegativer Bakterien dauerhaft weniger empfindlich gegenüber Desinfektionsmittel sind als Bakterien aus Stammsammlungen (Hiraishi, A., 1995, Le Chevalier, M. W., 1988, Leyval, C., 1984, Stickler, D. J., 1983). In der hier beschriebenen

Arbeit konnte gezeigt werden, dass das klinische Isolat *C. pneumoniae* *HK* gegenüber Chlorhexidin empfindlicher ist, als der schon lang bekannte Stamm *TW-183*.

7. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurde eine effektive und reproduzierbare Methode entwickelt, mit der Desinfektionsmittel gegen Chlamydien getestet werden können. Dabei wurde der durch die DIN EN 1040 geförderte Nachweis einer Bakterienreduktion um 5 log₁₀-Stufen realisiert. Mit dieser Methode wurden Chlorhexidin, PVP-Iod-Liposomen 5%, PVP-Iod-Liposomen 2,5% und Bataisodona PVP-Iod 10% gegen *C. trachomatis* serovar *D* und *C. pneumoniae* serovar TWAR sowie das klinische Isolat *HK* getestet. Es wurden je sechs Verdünnungen bei 0,5 min, 1 min und 5 min Einwirkungszeit mit und ohne 10%-FKS-Belastung geprüft.

Es zeigte sich, dass für alle Desinfektionsmittel eine Reduktion von fünf log₁₀-Stufen erreicht werden kann. Allerdings wurde dies beim Einsatz von Chlorhexidin gegen *C. trachomatis* serovar *D* mit 0% und 10% FKS-Belastung erst bei einer Einwirkungszeit von 5 min erreicht. Bei einer Einwirkungszeit von 1 min betrug der RF in diesem Fall bei 0% FKS-Belastung 2,93, bei 10% FKS-Belastung 0,38%. Beim Einsatz von Chlorhexidin gegen *C. pneumoniae* serovar *TW-183* wurde die Reduktion um 5 log₁₀-Stufen bei 0% FKS nach 1 min erreicht (RF(0,5min)=1,51), bei 10% FKS wurden 5 min benötigt (RF(1 min)=1,89).

Die Wirkung beider Desinfektionsmittel wird also durch Eiweiß vermindert. So wurde beim Einsatz von Chlorhexidin und PVP-Iod bei einer Eiweißbelastung mit 10% FKS die ca. vierfache Konzentration benötigt, um bei sonst gleichen Bedingungen einen RF=5 zu erreichen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Wirkung des PVP-Iodes weniger von der Konzentration abhängig ist als die des Chlorhexidins. Die Wirkung von Chlorhexidin ist stärker von der Einwirkungszeit abhängig als die des PVP-Iodes.

Die PVP-Iod-Liposomen haben bei gleicher Iod-Konzentration eine gleich gute, wenn nicht gar etwas bessere Wirkung als die wässrige Lösung. Beim Einsatz gegen *C. trachomatis* serovar *D* werden unter denselben Bedingungen ausnahmslos die gleichen

Iod-Konzentrationen benötigt, um einen RF von 5 zu erreichen. Beim Einsatz gegen *C. pneumoniae* serovar *TW-183* wird bei 0% FKS in wässriger Lösung die doppelte Iod-Konzentration benötigt wie bei den Liposomen. Dies zeigt sich auch bei Einsatz von 10% FKS und einer Einwirkungszeit von 5 min.

Innerhalb derselben Spezies gibt es Unterschiede in der Empfindlichkeit gegen die Desinfektionsmittel. Dies wird hauptsächlich beim Einsatz von Chlorhexidin unter 10% FKS-Belastung ersichtlich. Während bei dem klinischen Isolat *HK* von *C. pneumoniae* selbst bei der kurzen Einwirkungszeit von 0,5 min noch die volle Reduktion (RF=5) erreicht wird, ist das bei dem Stamm *TW-183* nur bei einer Reaktionszeit von 5 min möglich.

8. Anhang

8.1 PVP-Iod

8.1.1 Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* ohne FKS-Belastung

Es gilt: m = Mittelwert der bestimmten Reduktionsfaktoren, \hat{s} = Standardfehler.

Tabelle 10: PVP-Iod-Liposomen 5% – *C. trachomatis* serovar *D* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	M	\hat{s}
1:3200	-	-	-	-	-	-
1:1600	0,03	0,05	0,02	0,04	0,01	0,03
1:800	-0,02	0,03	0,00	0,02	0,01	0,05
1:400	-0,02	0,01	0,02	0,03	0,07	0,01
1:200	1,09	0,42	1,57	0,83	2,14	0,89
1:100	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:50	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:25	-	-	-	-	-	-

Tabelle 11: PVP-Iod-Liposomen 2,5% – *C. trachomatis* serovar *D* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 2,5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	M	\hat{s}
1:3200	-	-	-	-	-	-
1:1600	-	-	-	-	-	-
1:800	-0,03	0,01	0,01	0,04	0,02	0,01
1:400	-0,01	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03
1:200	0,04	0,03	0,03	0,02	0,09	0,04
1:100	0,99	0,43	1,45	0,68	2,56	1,22
1:50	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00

Tabelle 12: Betaisodona PVP-Iod 10% – *C. trachomatis* serovar *D* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	Betaisodona PVP-Iod 10%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	M	\hat{s}
1:3200	-0,06	0,04	-0,01	0,02	0,01	0,02
1:1600	-0,04	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00
1:800	0,01	0,05	0,02	0,00	0,02	0,02
1:400	0,15	0,16	0,11	0,10	0,14	0,11
1:200	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:100	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:50	-	-	-	-	-	-
1:25	-	-	-	-	-	-

8.1.2 Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. trachomatis* serovar *D* mit 10% FKS- Belastung

Es gilt: m = Mittelwert der bestimmten Reduktionsfaktoren, \hat{s} = Standardfehler.

Tabelle 13: PVP-Iod-Liposomen 5% – *C. trachomatis* serovar *D* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:800	-	-	-	-	-	-
1:400	-0,02	0,03	0,00	0,01	0,01	0,02
1:200	0,00	0,01	0,00	0,04	0,00	0,03
1:100	0,01	0,01	0,10	0,06	0,15	0,10
1:50	1,84	0,26	3,10	0,78	4,58	0,42
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:12,5	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:6,25	-	-	-	-	-	-

Tabelle 14: PVP-Iod-Liposomen 2,5% – *C. trachomatis* serovar *D* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 2,5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:800	-	-	-	-	-	-
1:400	-	-	-	-	-	-
1:200	-0,05	0,00	-0,02	0,01	-0,01	0,01
1:100	-0,02	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01
1:50	0,07	0,04	0,14	0,04	0,26	0,04
1:25	1,62	0,47	3,85	0,68	4,21	0,79
1:12,5	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:6,25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00

Tabelle 15: Betaisodona PVP-Iod 10% – *C. trachomatis* serovar *D* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	Betaisodona PVP-Iod 10%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:800	-0,05	0,03	0,00	0,01	-0,03	0,03
1:400	-0,05	0,01	-0,01	0,01	-0,02	0,03
1:200	-0,06	0,01	-0,04	0,01	-0,02	0,04
1:100	0,26	0,14	0,75	0,41	1,21	0,78
1:50	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:12,5						
1:6,25						

8.1.3 Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* ohne FKS-Belastung

Es gilt: m = Mittelwert der bestimmten Reduktionsfaktoren, \hat{s} = Standardfehler.

Tabelle 16: PVP-Iod-Liposomen 5% – *C. pneumoniae* serovar *TW-183* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:1600	-	-	-	-	-	-
1:800	0,02	0,06	0,00	0,05	-0,03	0,03
1:400	0,10	0,05	0,05	0,07	0,01	0,04
1:200	0,63	0,00	0,46	0,10	0,47	0,09
1:100	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:50	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:12,5	-	-	-	-	-	-

Tabelle 17: PVP-Iod-Liposomen 2,5% – *C. pneumoniae* serovar *TW-183* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 2,5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:1600						
1:800						
1:400	0,00	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02
1:200	0,02	0,03	0,10	0,03	0,07	0,04
1:100	0,52	0,15	0,58	0,13	0,58	0,09
1:50	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:12,5	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00

Tabelle 18: Betaisodona PVP-Iod 10% – *C. pneumoniae* serovar *TW-183* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	Betaisodona PVP-Iod 10%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:1600	0,04	0,06	0,00	0,03	-0,04	0,01
1:800	0,02	0,04	0,01	0,03	-0,06	0,02
1:400	0,07	0,06	0,06	0,05	0,08	0,06
1:200	3,69	0,67	2,75	1,28	2,73	1,25
1:100	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:50	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:25						
1:12,5						

8.1.4 Wirkung von PVP-Iod-Desinfektionsmittel auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* mit 10% FKS-Belastung

Es gilt: m = Mittelwert der bestimmten Reduktionsfaktoren, \hat{s} = Standardfehler.

Tabelle 19: PVP-Iod-Liposomen 5% – *C. pneumoniae* serovar *TW-183* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:800	-	-	-	-	-	-
1:400	-0,07	0,02	-0,08	0,02	0,01	0,02
1:200	-0,02	0,01	-0,05	0,01	-0,01	0,02
1:100	0,28	0,17	0,22	0,19	0,34	0,24
1:50	4,17	0,25	4,83	0,17	5,00	0,00
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:12,5	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:6,25	-	-	-	-	-	-

Tabelle 20: PVP-Iod-Liposomen 2,5% – *C. pneumoniae* serovar *TW-183* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 2,5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:800	-	-	-	-	-	-
1:400	-	-	-	-	-	-
1:200	-0,06	0,03	-0,04	0,02	-0,01	0,01
1:100	-0,03	0,03	-0,05	0,02	0,04	0,03
1:50	0,13	0,11	0,28	0,22	0,71	0,57
1:25	3,25	0,89	4,65	0,35	5,00	0,00
1:12,5	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:6,25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00

Tabelle 21: Betaisodona PVP-Iod 10% – *C. pneumoniae* serovar *TW-183* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	Betaisodona PVP-Iod 10%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	\hat{s}	m	\hat{s}	m	\hat{s}
1:800	-0,08	0,04	-0,07	0,04	-0,02	0,02
1:400	-0,05	0,01	-0,05	0,04	-0,02	0,01
1:200	0,04	0,05	0,02	0,06	0,07	0,08
1:100	2,57	1,34	3,12	1,41	3,48	1,52
1:50	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:12,5	-	-	-	-	-	-
1:6,25	-	-	-	-	-	-

8.1.5 Wirkung von PVP-Iod-Liposomen 5% auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* ohne
FKS-Belastung

Tabelle 22: PVP-Iod-Liposomen 5% – *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	ŝ	m	ŝ	m	ŝ
1:800	0,07	0,03	0,07	0,01	0,08	0,02
1:400	0,07	0,01	0,08	0,01	0,16	0,05
1:200	0,35	0,04	0,36	0,08	0,62	0,44
1:100	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:50	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00

8.1.6 Wirkung von PVP-Iod-Liposomen 5% auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* mit 10%
FKS-Belastung

Tabelle 23: PVP-Iod-Liposomen 5% – *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	PVP-Iod-Liposomen 5%					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Verdünnung:	m	ŝ	m	ŝ	m	ŝ
1:400	-0,02	0,03	0,01	0,02	-0,02	0,04
1:200	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03	0,05
1:100	0,17	0,06	0,14	0,08	0,18	0,10
1:50	2,58	0,46	3,27	0,18	4,28	0,40
1:25	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00
1:12,5	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00

8.2 Chlorhexidin

8.2.1 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. trachomatis* serovar *D* ohne FKS-Belastung

Tabelle 24: Chlorhexidin – *C. trachomatis* serovar *D* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	Chlorhexidin					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Konzentration:	m	ŝ	m	ŝ	m	ŝ
0,00625%	0,05	0,03	0,07	0,05	0,29	0,03
0,0125%	0,08	0,02	0,20	0,03	1,07	0,10
0,025%	0,32	0,03	0,34	0,02	3,19	0,20
0,05%	0,21	0,05	0,43	0,02	5,00	0,00
0,1%	0,33	0,03	1,07	0,01	5,00	0,00
0,2%	1,03	0,01	2,93	0,15	5,00	0,00

8.2.2 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. trachomatis* serovar *D* mit 10% FKS-Belastung

Tabelle 25: Chlorhexidin – *C. trachomatis* serovar *D* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	Chlorhexidin					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Konzentration:	m	ŝ	m	ŝ	m	ŝ
0,00625%	-0,01	0,02	-0,01	0,01	0,12	0,02
0,0125%	0,01	0,01	0,04	0,01	0,26	0,06
0,025%	0,12	0,05	0,03	0,05	0,47	0,03
0,05%	0,05	0,04	0,11	0,03	0,95	0,13
0,1%	0,14	0,05	0,19	0,06	2,83	0,63
0,2%	0,19	0,08	0,38	0,13	5,00	0,00

8.2.3 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* serovar *TW-183* ohne FKS-Belastung

Tabelle 26: Chlorhexidin – *C. pneumoniae* serovar *TW-183* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	Chlorhexidin					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Konzentration:	m	ŝ	m	ŝ	m	ŝ
0,00625%	-0,01	0,01	0,04	0,02	0,10	0,05
0,0125%	-0,01	0,01	0,06	0,03	0,21	0,02
0,025%	0,26	0,03	0,20	0,02	0,53	0,05
0,05%	0,12	0,08	0,35	0,05	5,00	0,00
0,1%	0,42	0,08	1,31	0,09	5,00	0,00
0,2%	1,51	0,06	5,00	0,00	5,00	0,00

8.2.4 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* serovar *TW-143* mit 10% FKS-Belastung

Tabelle 27: Chlorhexidin – *C. pneumoniae* serovar *TW-183* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	Chlorhexidin					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Konzentration:	m	ŝ	m	ŝ	m	ŝ
0,00625%	0,10	0,04	0,05	0,05	0,06	0,01
0,0125%	0,13	0,03	0,40	0,01	0,31	0,07
0,025%	0,45	0,14	0,50	0,06	0,53	0,07
0,05%	0,37	0,09	0,54	0,10	1,72	0,05
0,1%	0,51	0,03	0,76	0,03	5,00	0,00
0,2%	0,75	0,05	1,89	0,07	5,00	0,00

8.2.5 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* ohne FKS-Belastung

Tabelle 28: Chlorhexidin – *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* – 0% FKS

Desinfektionsmittel:	Chlorhexidin					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Konzentration:	m	ŝ	m	ŝ	m	ŝ
0,00625%	-0,01	0,06	0,07	0,04	0,18	0,04
0,0125%	0,08	0,05	0,17	0,04	0,37	0,06
0,025%	0,15	0,07	0,59	0,03	1,67	0,11
0,05%	0,36	0,07	0,94	0,09	5,00	0,00
0,1%	0,88	0,11	5,00	0,00	5,00	0,00
0,2%	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00

8.2.6 Wirkung von Chlorhexidin auf *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* mit 10% FKS-Belastung

Tabelle 29: Chlorhexidin – *C. pneumoniae* klinisches Isolat *HK* – 10% FKS

Desinfektionsmittel:	Chlorhexidin					
Reaktionszeit [min]:	0,5		1		5	
Konzentration:	m	ŝ	m	ŝ	m	ŝ
0,00625%	-0,08	0,03	-0,03	0,01	0,11	0,09
0,0125%	-0,05	0,02	0,13	0,02	0,38	0,06
0,025%	0,07	0,02	0,48	0,05	0,75	0,03
0,05%	0,21	0,03	0,66	0,02	5,00	0,00
0,1%	0,86	0,16	5,00	0,00	5,00	0,00
0,2%	5,00	0,00	5,00	0,00	5,00	0,00

8.3 Zusammensetzung des verwendeten PBS

H ₂ O bidest.	1l
NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,2g

Nach Mischung erfolgt die Autoklavierung des PBS.

Literaturverzeichnis

1. **Aldous, M. B., J. T. Grayston, S.-P. Wang und H. M. Foy.** 1992. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families 1966-1979. J Infect Dis. Sep ; 166(3) :646-9.
2. **Anderson, R. L., B. W. Holland, J. K. Carr., W. W. Bond und M. S. Favero.** 1990. Effect of disinfectants on pseudomonas colonized on the interior surface of P VC pipes. Am J Public Health, Jan80(1):17-21.
3. **Apostolov, K.** 1980. The effects of iodine on the biological activities of myxoviruses. J. Hyg. 84:381-388.
4. **Barett-Bee, K., L. Newbould und S. Edwards.** 1994. The membrane destabilizing action of the antibacterial agent chlorhexidine. FEMS Microbiol. Lett. 119:249-254.
5. **Beem, M. O. und E. M. Saxon.** 1977. Respiratory-tract colonization and a distinctive pneumonia syndrome in infants infected with *Chlamydia trachomatis*. N. Engl. J. Med. Feb 10;296(6):306-10.
6. **Benevento, W. J., P. Murray, C. A. Reed and J. S. Pepose** 1990. The Sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Herpes simplex Type II* to Disinfection with Povidone-Iodine. Am. J. Ophtalmol. (109) 329-333.
7. **Best, M., V. S. Springthorpe und S. A. Sattar.** 1994. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants; studies with a mixture of five types of micro-organisms. Am. J. Infect. Control. 22:152-162.
8. **BGA-Bundesgesundheitsamt** 1982, Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. Bundesgesundheitsbl. 25 Nr. 12, S. 397.
9. **Bradley, C. R. and A. P. Fraiese.** 1996. Heat and chemical resistance in enterococci. J. Hosp. Infect. 34: 191-196.
10. **Braun, J., L. Laitko, J. Treharne, U. Eggens, P. Wu, A. Distler und J. Siepber.** 1994. *Chlamydia pneumoniae* – a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. Ann. Rheum. Dis. 53:100-105.

11. **CDC, Center for Disease Control and Prevention.** 1998. Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Disease. MMWR 47; 61-67.
12. **Chang, S. L.** 1971. Modern concept of disinfection. J. sanit. Eng. Div. Proc. ASCE 97:689.
13. **Chopra, I.** 1987. Microbial resistance to veterinary disinfectants and antiseptics. S. 43-65. In A. H. Linton, W. B. Hugo und A. D. Russell (ed.), Disinfection in veterinary and farm animal practice. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, England.
14. **Denyer, S. P.** 1995. Mechanisms of action of antibacterial biocides. Int. Biodeterior. Biodegrad. 36:227-245.
15. **DIN EN 1040.** 1997. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Bakterizide Wirkung (Basistest), Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1), Deutsche Fassung EN 1040. DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin.
16. **DIN EN 1276.** 1997. Qualitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen. DIN Deutsches Institut für Normung e. V.
17. **DIN EN 1656.** 1995. Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich. Deutsches Institut für Normung e. V.
18. **DIN EN 12353.** 1996. Haltung von Bakterien- und Pilzstämmen, die zur Prüfung der bakteriziden und fungiziden Wirkung eingesetzt werden. Deutsche Institut für Normung e. V.
19. **DVG – Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft.** 1988. Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel Desinfektion, Lfg. 4, 4/93
20. **Ekman, M.-R., s. J. Rasmussen, P. Timms, M. Sarvas und P. Saikku.** 1993. Polymerase chain reaction and indirect immunofluorescence for detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical samples, abst. C-313, S. 501. In abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology 1993. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

21. **El-Moug, T., D. T. Rogers, J. R. Furr, B. M. A. El-Falaha und A. D. Russell.** 1985. Antiseptic-induced changes in the cell surface of a chlorhexidine-sensitive and a chlorhexidine-resistant strain of *Providencia stuartii*. J. Antimicrob. Chemother. 16:685-689.
22. **Erntell, M., K. Ljunggren, T. Gadd und K. Persson.** 1989. Erythema nodosum – a manifestation of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection. Scand. J. Infect. Dis. 21:693-696.
23. **Everett, K. D., R. M. Bush and A. A. Andersen.** 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. Apr. 49 Pt 2:415-40.
24. **Fiedler, K.** 1995. Chemische Desinfektion. S. 123-124 in Klaus Fiedler Hygiene, Präventivmedizin, Umweltmedizin systematisch. 1. Auflage. ISBN 3-89599-101-5
25. **Fitzgerald, K. A. A. Davies und A. D. Russell.** 1989. Uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin. FEMS Microbiol. Lett. 60:327-332.
26. **Forsey, T., S. Darougar und J. D. Treharne.** 1986. Prevalence in human beings of antibodies to *Chlamydia* IOL-207, an atypical strain of chlamydia. J. Infect. 12:145-152.
27. **Fujiyama, H., T. Sakai, K. Aoki, H. Adachi, C. Yamaha und K. Tamura.** 1965. Culture of trachoma virus on developing chick embryo and electron microscopic studies thereof. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. Jul.; 69(7) :660-72.
28. **Furr, J. R.** a. Sensitivity of protozoa to disinfection B. *Acanthamoeba* and contact lens solutions. In A. D. Russell, W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe (ed.), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed. , in press. Blackwell Science, Oxford, England.
29. **Gardner, J. F. und K. G. Gray.** 1991. Chlorhexidine. p. 251-270. In S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

30. **Gebel, J., H.-P. Werner, A. Kirsch-Altena und K. Bansemir.** 2001. Standardmethoden der DGHM zur Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren. Entwurf Stand 1.3.2001. mhp Verlag GmbH Ostring 13, D-65205 Wiesbaden.
31. **Gordon F. B., R. L. Woolridge, A. L. Quan, J. D. Gillmore, H. G. Arm, Y. F. Yang und G. B. Magruder.** 1972. Field studies on McCoy cell cultures for detection of *Chlamydia trachomatis*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. Mar;3(1):69-78.
32. **Gottardi, W.** 1991. Iodine and iodine compounds. S. 152-166. In S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation. 4th ed. Lea & Febinger, Philadelphia, Pa.
33. **Grayston, J. T.** 1992. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. Clin. Infect. Dis. Nov.;15(5):757-61
34. **Grayston, J. T.** 1994. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) infections in children. Pediatr. Infect. Dis. J. 13:675-685.
35. **Grayston, J. T., C.-C. Kuo, S.-P. Wang und J. Altman.** 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infection. N. Engl. J. Med. 315:161-168.
36. **Grayston, J. T., M. B. Aldous, A. Easton, S.-P. Wang, C.-C. Kuo, L. A. Campbell und J. Altman.** 1993. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. J. Infect. Dis. 168: 1231-1235.
37. **Grayston, J. T., V. K. Diwan, M. Cooney und S.-P. Wang.** 1989. Community- and hospital-acquired pneumonia associated with *Chlamydia* TWAR infection demonstrated serologically. Arch. Intern. Med. 149:169-173.
38. **Grönhagen-Riska, C., P. Saikku, H. Riska, B. Froseth und J. T. Grayston.** 1988. Antibodies to TWAR – a novel type of *Chlamydia* – in sarcoidosis. S. 297 – 301. In C. Grassi, G. Rizzato, and E. Pozzi (ed.), Sarcoidosis and other granulomatous disorders. Excerpta Medica, Amsterdam.
39. **Hahn, D. L., R. W. Dodge und R. Golubjatnikov.** 1991. Association of *C. pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. JAMA 266:225-230.

40. **Hahn, H.** 1994. Chlamydien. In H. Hahn, D. Falke, P. Klein. (Hrsg.), Medizinische Mikrobiologie. 2. Auflage. S. 490-496. Springer-Verlag, ISBN 3-540-57674-6.
41. **Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G., Wichtl, M.,** 1998. Arzneibuch-Kommentar, wissenschaftliche Erläuterungen zum Europäischen Arzneibuch und zum Deutschen Arzneibuch. 9. Lieferung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn
42. **Hashigucci, K., H. Ogawa, T. Suzuki und Y. Kazuyama.** 1992. Isolation of chlamydia *pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. Clin. Infect. Dis. 15: 570-571.
43. **Herold, F. M., J. R. Baarda, C. Baron und A. Abrams.** 1969. Dio 9 and chlorhexidine, Inhibition of membrane bound ATPase and of cation transport in *Streptococcus faecalis*. Biochim. Biophys. Acta 183:129-136.
44. **Hingst, V., C. Wurster, H.-G. Sonntag.** 1990. A Quantitative Test Method for the Examination of Antimycobacterial Disinfection Procedures. Zbl. Hyg. 190, 127-140.
45. **Hiom, S. J., A. C. Hann, J. R. Furr und A. D. Russell.** 1995a. X-ray microanalysis chlorhexidine-treated cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Lett. Appl. Microbiol. 20: 353-356.
46. **Hiom, S. J., J. R. Furr und J. R. Dickinson.** 1995. Uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate on by *Saccharomyces cervisiae*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Lett. Appl. Microbiol. 21:20-22.
47. **Hiom, S. J., J. R. Furr, A. D. Russell and A. C. Hann.** 1996. The possible role of yeast cell walls in modifying cellular response to chlorhexidine diacetate. Cytobios 86:123-135.
48. **Hiom, S. J., J. R. Furr, A. D. Russell and J. R. Dickinson.** 1992. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *C. glabrata* and *Saccharomyces cervisiae*. J. Appl. Bacteriol. 72:335-340.
49. **Hiom, S. J., J. R. Furr, A. D. Russell und J. R. Dickinson.** 1993. Effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cervisiae*. Microbios 74:111-120.

50. **Hiraishi, A., K. Furunata, A. Matsumoto, K. A. Koike, M. Fukuyama und K. Tabuchi.** 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2099-2107.
51. **Houang, E. T., O. J. A. Gilmore, C. Reid und E. J. Shaw.** 1976. Absence of bacterial resistance to povidone iodine. *J. clin. Path.*, 29, 752-755.
52. **Hugo, W. B.** Disinfection mechanisms. In A. D. Russel, W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe (ed.), *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, 3rd. ed., in press. Blackwell Science, Oxford, England.
53. **Hugo, W. B. und A. R. Longworth.** 1964. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.* 16:655-662.
54. **Hugo, W. B. und A. R. Longworth.** 1965. Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J. Pharm. Phamacol.* 17:28-32.
55. **Hugo, W. B. und A. R. Longworth.** 1966. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic content, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Phar. Pharmacol.* 18:569-578.
56. **Isenberg, S. J., L. Apt and M. Wood.** 1995. A controlled trial of povidone-iodine as prophylaxis against ophtalmia neonatorum. *The New England Journal of Medicine*, Vol.332, No.9:562-566.
57. **Johnston M. D., E. A. Simons und R. J. Lambert.** 2000. One explanation for the variability of the bacterial suspension test. *J Appl Microbiol* 2000 Feb; 88 (2):237-42.
58. **Kanamoto, Y., K. Ouchi, M. Mizui, M. Ushio und T. Usui.** 1991. Prevalence of antibody to *Chlamydia pneumoniae* TWAR in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 29:816-818.
59. **Khunkitti, W., D. Lloyd, J. R. Furr und A. D. Russell.** 1996. The lethal effects of biguanides on cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Appl. Microbiol.* 81:73-77.
60. **Khunkitti, W., D. Lloyd, J. R. Furr und A. D. Russell.** 1997a. Aspects of the mechanisms of action of biguanides on cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Appl. Microbiol.* 82:107-114.

61. **Khunkitti, W., A. C. Hann, D. Lloyd, J. R. Furr und A. D. Russell. a. Biguanide-induced changes in *Acanthamoeba castellanii*: an electron microscopic study. J. Appl. Microbiol., in press.**
62. **Khunkitti, W., D. Lloyd, J. R. Furr und A. D. Russell. b. *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. J. Infect. , in press.**
63. **Khunkitti, W., S. V. Avery, D. Lloyd, J. R. Furr and A. D. Russell. 1997. Effects of biocides on *Acanthamoeba castellanii* as measured by flow cytometry and plaque assay. J. Antimicrob. Chemother. 40:223-227.**
64. **Kleemola, M., P. Saikku, R. Visakorpi, S.-P. Wang und J. T. Grayston. 1988. Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new *Chlamydia* organism, in military trainees in Finland. J. Infect. Dis. 157: 230-236.**
65. **Klingbeil, W. 1982. Therapy of acute diseases of the upper airway. Comparison of 2 antiseptic pharyngeal sprays I otorhinolaryngologic practice. Fortschr. Med. 100(4):146-9.**
66. **Kruse, W. C. 1970. Halogen action on bacteria, viruses and protozoa. S. 113-137. In Proceedings of the National Special Conference on Disinfection. ASCE, Amherst, Mass.**
67. **Kuo, C.-C. und J. T. Grayston. 1990. Amino acid requirements for growth of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture: growth enhancement by lysine or methionine depletion. J. Clin. Microbiol. 28:1098-1100.**
68. **Kuo, C.-C., A. Shor, L. A. Campbell, H. Fukushi, D. L. Paton und J. T. Grayston. 1993. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. J. Infect. Dis. 167: 841-849.**
69. **Kuo, C.-C., E. Y. Chi und J. T. Grayston. 1988. Ultrastructural study of entry of *Chlamydia* strain TWAR into HeLa cells. Infect. Immun. 56:1668-1672.**
70. **Kuo, C.-C., H.-H. Chen, S.-P. Wang und J. T. Grayston. 1986. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. J. Clin. Microbiol. 24:1034-1037.**
71. **Kuyyakanond, T. and L. B. Quesnel. 1992. The mechanism of action of chlorhexidine. FEMS Microbiol. Lett. 100:211-216.**

72. **Lampe, M. F., L. M. Ballweber and W. E. Stamm.** 1998. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to Chlorhexidine Gluconate Gel. Antim. Agents and Chemoth. Vol. 42, No. 7, p. 1726-1730.
73. **Lanker Klossner B., H. R. Widmer und F. Frey.** 1997. Nondevelopment of resistance by bacteria during hospital use of povidone-iodine. Dermatology 195, Suppl. 2:10-3.
74. **Le Chevalier, M. W., C. C. Cawthorn und R. G. Lee.** 1988. Mechanisms of bacterial survival in chlorinated water supplies. Appl. Environ. Microbiol. 54:2492-2499.
75. **Leyval, C., C. Arz, J. C. Block und M. Rizet.** 1984. Escherichia coli resistance to chlorine after successive chlorinations. Environ. Technol. Lett. 5:359-364.
76. **Lieberman, D., P. Shvartzman, D. Lieberman, M. Ben-Yaakov, Z. Lazarovich, S. Hoffman, R. Mosckovitz, B. Ohana, M. Leinonen, D. Luffy and I. Boldur.** 1998. Etiology of respiratory tract infection in adults in a general practice setting. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. (10) :685-9.
77. **Longworth, A. R.** 1971. Chlorhexidine, S. 95-106. In W. B. Hugo (ed.), Inhibition and destruction of the microbial cell. Academic Press, Ltd., London, England.
78. **Lopez-Hurtado, M., A. Zamora-Ruiz, S. Flores-Medina und F. M. Guerra-Infante.** 1999. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in newborn infants with respiratory problems.
79. **Lyons, J. M. und I. I. James Jr.** 1995. Reducing the Risk of *Chlamydia trachomatis* Genital Tract Infection by Evaluating the Prophylactic Potential of Vaginally Applied Chemicals. Clinical Infectious Diseases, 21(Suppl 2): S. 174-7.
80. **Maillard, J. -Y., T. S. Beggs, M. J. Day, R. A. Hudson und A. D. Russell.** 1994. Effect of biocides on MS2 and K coliphages. Appl. Environ. Microbiol. 60:2205-2206.
81. **Maillard, J.-Y., A. C. Hann, T. S. Beggs, M. J. Day, R. A. Hudson und A. D. Russel.** 1995a. Energy dispersive analysis of x-rays study of the distribution of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on the *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage F116. Lett. Appl. Microbiol. 20:357-360.

82. **Maillard, J.-Y., T. S. Beggs, M. J. Day, R. A. Hudson und A. D. Russell.** 1995. Effects of biocides on the transduction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by F116 bacteriophage. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:215-218.
83. **Markham, R. H. S. J. Richmon, N. W. Walshaw und D. L. Easty.** 1977. Severe persistent inclusion conjunctivitis in a young child. *Am. J. Ophthalmol.* Mar;83(3):414-6.
84. **Marrie, T. J., J. T. Grayston, S.-P. Wang und C.-C, Kuo.** 1987. Pneumonia associated with the TWAR strain of *Chlamydia*. *Ann. Intern. Med.* 106: 507-511.
85. **Marrie, T. J., M. Marczy, O. E. Mann, R. W. Landymore, A. Raza, S.-P. Wang und J. T. Grayston.** 1990. Culture-negative endocervicitis probably due to *Chlamydia pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 161:127-129.
86. **Marton, A., A. Károlyi und A. Szalka.** 1992. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in Hungary. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:139-142.
87. **Mbithi, J. N., V. S. Springthorpe und S. A. Sattar.** 1990. Chemical disinfection of hepatitis: a virus on environmental surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3601-3604.
88. **McCormack, W. M., B. Rosner, D. E. McComb, J. R. Evrard und S. H. Zinner.** 1985. Infection with *Chlamydia trachomatis* in female college students. *Am. J. of Epidemiol.* Vol. 121,1,107-115.
89. **Michel, D., J. C. Antoine, B. Pozzetto, O. G. Gaudin und F. Lucht.** 1992. Lumbosacral meningoradiculitis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. *J. Neuro. Neurosurg. Psychiatry* 55:511.
90. **Montes, M. und G. Cilla.** 1992. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in children and young adults in Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11:972-973.
91. **Mordhost, C. H., S.-P. Wang und J. T. Grayston.** 1992. Outbreak of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR infection in four farm families. *Eur. J. Clin. Microbio. Infect. Dis.* 11:617-620.

92. **Mordhost, C. H., S.-P. Wang und J. T. Grayston.** 1994. Transmission of *C. pneumoniae* (TWAR). S. 488-419. In J. Orfila, G. I. Byrne, M. A. Cherneskey, J. T. Grayston, R. P. Jones, G. L. Ridgway, P. Saikku, J. Schachter, W. E. Stamm und R. S. Stephens (ed.), Chlamydial infections-1994. Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy.
93. **Nisbet, I. T., Graham, D. M., Spicer, P. E. und g. J. Tibbs.** 1979. Chlorhexidine as an Effective Agent Against Chlamydia *trachomatis* In Vitro and In Vivo. Antimicrobial Agent and Chemotherapy, Dec. S.855-857.
94. **Ogawa, H., K. Hashiguchi und Y. Kazuyama.** 1992. Recovery of Chlamydia *pneumoniae* in six patients with otitis media and effusion. J. Laryngol. Otol. 106:490-492.
95. **Park, J. B. und N. H. Park.** 1989. Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. Oral surg. 67: 149-153.
96. **Patnode, D., S.-P. Wang und J. T. Grayston.** 1990. Persistence of Chlamydia *pneumoniae*, strain TWAR, micro-immunofluorescent antibody. S. 406-409. In W. R. Bowie, H. D. Caldwell, R. P. Jones, P.-A. Mårdh, G. L. Ridgway, J. Schachter, W. E. Stamm und M. E. Ward (ed.), Chlamydial infections-1990. Cambridge University Press, Cambridge.
97. **Petersen, E. E., A. Clad, R. Mendel, J. Prillwitz und K. Hintz,** 1996. Prevalence of Chlamydial Infections in Germany: Screening of Asymptomatic Women and Men by Testing First Void Urine by Ligase Chain Reaction (LCR). Proceedings 3. Meeting Europ. Soc. For Chlamydial Research, Vienna 415.
98. **Pitche, P., A. Plinga und K. Tchangai-Walla.** 1998. Lymphogranuloma venereum. Santé. May-Jun; 8(3):239-44.
99. **Prince, H. N., D. L. Prince und R. N. Prince.** 1991. Principles of viral control and transmission. S. 411-444. In S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation, 4 th. ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
100. **Quinn, T. C., S. E. Goodell, E. Mkrtichian, M. D. Schuffler, W. P. Wang, W. E. Stamm und K. K. Holmes.** 1981. Chlamydia *trachomatis* proctitis. N. Engl. J. Med. Jul 23;305(4):195-200.

101. **Ranganthan, N. S.** 1996. Chlorhexidine, p. 235-264. In J. M. Ascenzi (ed.), Handbook of disinfectants and antiseptics. Marcel Dekker, Ink., New York, N.Y.
102. **Reeve, P.** 1976. The inactivation of *Chlamydia trachomatis* by povidone-iodine. J. of Antim. Chemoth. 2, 77-80.
103. **Richmond, S. J.** 1975. The inactivation of *Chlamydia trachomatis* by chlorhexidine ("Hibitane"). The journal of anti-microbial chemotherapy: JAC Band 3 S. 523-525.
104. **Robert Koch-Institut** 1995. Richtlinie des Robert Koch-Institutes zur Prüfung der Viruzidie von chemischen Flächendesinfektionsmitteln und Instrumentendesinfektions-mitteln, die in die Liste gemäß § 10 c des Bundes-Seuchengesetzes aufgenommen werden sollen. Bundesgesundheitsblatt Sonderdruck
105. **Rödel, J., E. Straube, W. Lungershausen, M. Hartmann und A. Groh.** 1998. Secretion of cytokines by human synoviocytes during in vitro infection with *Chlamydia trachomatis*. J Rheumatol. 25(11): 2161-8.
106. **Roesger, M.** 1984. Versuche zur Eliminierung der Toxizität für Zellkulturen von Reaktionsgemischen aus Virus und Desinfektionswirkstoffen. Dissertation
107. **Rosenberg, A., S. D. Alatary und A. F. Peterson.** 1976. Safety and efficacy of the antiseptic chlorhexidine gluconate. Surg. Gynecol. Obstet. 143; 789-792.
108. **Rote Liste.** 2002. Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte). Herausgeber: Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main. Editio Cantor Verlag, Aulendorf.
109. **Russell A. D. und I. Chopra.** 1996. Understanding antibacterial action and resistance, 2nd ed. Ellis Horwood, Chichester, England.
110. **Russell A. D. und M. J. Day.** 1993. Antibacterial activity of chlorhexidine. J. Hosp. Infect. 25:229-238.
111. **Russell A. D. und M. J. Day.** 1996a. Antibiotic and biocide resistance in bacteria. Microbios 85:45-65.
112. **Russell A. D. und N. J. Russell.** 1995. Biocides: activity, action and resistance. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 53:327-365.
113. **Russell, A. D.** 1996b. Activity of biocides against mycobacteria. J. Appl. Bacteriol, Symp. 81:87S-101S.

114. **Russell, A. D.** 1990. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. Clin. Microbiol. Rev. 3:99-119.
115. **Russell, A. D. und J. R. Furr.** 1977. The antibacterial activity of a new chloroxylenol formulation containing ethylenediamine tetraacetic acid. J. Appl. Bacteriol. 43:253-260.
116. **Russell, A. D. und W. B. Hugo.** 1988. Perturbation of homeostatic mechanisms in bacteria by pharmaceuticals. S. 206-219. In R. Whittenbury, G. W. Gould, J. G. Banks and R. G. Board (ed.). Homeostatic mechanisms in microorganisms. Bath University Press, Bath, England.
117. **Russell, A. D., B. D. Jones und P. Milburn.** 1985. Reversal of the inhibition of bacterial spore germination and outgrowth by antibacterial agents. Int. J. Pharm. 25:105-112.
118. **Rutala, W. A.,** 1995. APIC guidelines for selection and use of disinfectants. Am. J. Infect. Control 23:313-342.
119. **Saikkku, P., P. Ruutu, M. Leinonen, J : Panelius, T. E. Tupasi und J. T. Crayston.** 1988. Acute lower-respiratory-tract infection associated with chlamydial TWAR antibody in Filipino children. J. Infect. Dis. 158:1095-1097.
120. **Sampietro C. D., G. Bisognano, F. Fulia, A. Marino und I. Barberi.** 1999. Chlamydia *trachomatis* conjunctivitis in the newborn. Arch. Pediatr. Mar;6(3):317-20.
121. **Schmidt, J., G. Naumann und W. Horsch.** 1968. Chemische Desinfektionsmittel in Sterilisation Desinfektion und Entwesung S. 205. VEB Georg Thieme Leipzig.
122. **Schneider, W.** 1986. Untersuchungen zur Beeinflussung der Tenazität von Chlamydien in „Konservierungsmedien“ bei Temperaturen über und unter 0° C. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktergrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
123. **Shaker, A. D., A. D. Russell und J. R. Furr.** 1986. Aspects of the action of chlorhexidine on bacterial spores. Int. J. Pharm. 34:51-56.
124. **Shaker, L. A., B. N. Dancer, A. D. Russell und J. R. Furr.** 1988. Emergence and development of chlorhexidine resistance during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. FEMS Microbiol. Lett. 51:73-76.

125. **Shaker, L. A., J. R. Furr and A. D. Russell.** 1988a. Mechanisms of resistance of *Bacillus subtilis* spores to chlorhexidine. *J. Appl. Bacterio.* 64:531-539.
126. **Springthorpe, V. S. und S. A. Satter.** 1990. Chemical disinfection of viruscontaminated surfaces. *Crit. Rev. Environ. Control* 20:169-229.
127. **Springthorpe, V. S., J. L. Grenier, N. Lloyd-Evans und S. A. Sattar.** 1986. Chemical disinfection of human rotaviruses: efficacy of commercially-available products in suspension tests. *J. Hyg.* 97. 97:139-161.
128. **Stickler, D. J., V. Thomas, J. C. Clayton und J. A. Chawala.** 1983. Studies of the genetic basis of chlorhexidine resistance. *Br. J. Chlin. Pract. Symp. Suppl.* 25:23-28.
129. **Tan, J. S.** 1999. Role of "atypical" pneumonia pathogens in respiratory tract infections. *Can. Respir. J.*, 6 Suppl A:15A-9A.
130. **Terho, P.** 1982. *Chlamydia trachomatis* and clinical genital infections: a general review. *Infection*; 10 Suppl 1:S5-9.
131. **Theunissen, H. J. H., N. A. Lemmens-den Toom, A. Burggraaf, E. Stolz und M. F. Michel.** 1993. Influence of temperature and relative humidity on the survival of *Chlamydia pneumoniae* in aerosols. *Appl. Enviorn. Microbiol.* 59: 2589-2593.
132. **Thom, D. H., J. T. Grayston, S.-P. Wang, C.-C. Kuo und J. Altman.** 1990. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR, *Mycoplasma pneumoniae* and viral infections in acute respiratory disease in a university student health clinic population. *Am. J. Epidemiol.* 132:248-256.
133. **Thomas, B. J.** 1978. The Inactivation of *Chlamydia trachomatis* By Betadine Solution. *In* The proceedings of the Word Congress on Antisepsis. World Congress on Antisepsis <1976, Limburg, Lahn> New York HP Publ. Co. 0-913800-10-4.
134. **Thomas, D., F. Orfila and E. Bissac.** 1984. Action de différents antiseptiques sur *Chlamydia trachomatis*. *Pathol. Biol.* 32(5 Pt 2) : 544-546.
135. **Vogel, F., H. Worth, D. Adam, W. Elies, S. Ewig, G. Höffken, H. Lode, J. Lorenz, H. Scholz, W. Stille, K. Unertl und B. Wiedemann.** 2000. Rationale Therapie bakterieller Atemwegsinfektionen. Sonderdruck aus *Chemother. J.* 9:3-23.

136. **Wang, S.-P. und J. T. Grayston.** 1986. Microimmunofluorescence serological studies with the TWAR organism, S. 329-332. In d. Oriel, G. Ridgway, J. Schachter, D. Taylor-Robinson und M. Ward (ed.), Chlamydial infections-1986. Cambridge University Press, Cambridge.
137. **Wang, S.-P. und J. T. Grayston.** 1990. Population prevalence antibody to Chlamydia *pneumoniae*, strain TWAR. S. 402-405. In W. R. Bowie, H. D. Caldwell, R. P. Jones, P.-A. Mårdh, G. L. Ridgway, J. Schachter, W. E. Stamm und M. E. Ward (ed.), Chlamydial infections. Cambridge University Press, Cambridge.
138. **Weinstock, H. S., G. A. Bolan, R. Kohn, C. Balladares, A. Back und G. Olivia.** 1991. Chlamydia *trachomatis* infection in women: a need for universal screening in high prevalence populations?
Am. J. of Epidemiol., Vol. 135,1,41-47.
139. **Weiss, H.** 1986. Buffer incompatibility and antimicrobial activity of chlorhexidine acetate and digluconate. Pharmazie, Dec;41(12):87-8.
140. **Wergen, M.** 1986. Die Wirkung von Desinfizientien, bezogen auf die Zellverträglichkeit in Zellkulturen. Dissertation.
141. **WHO-World Health Organisation.** 1996. International Alliance formed for Elimination of Trachoma. Press release WHO/82.
142. **Wutzler, P., A. Sauerbrei, R. Klocking, J. Burkhardt, M. Schacke, R. Thust, W. Fleischer und K. Reimer.** 2000. Virucidal and chlamydicidal activities of eye drops with povidone-iodine liposome complex. Ophthalmic Res. Mar-Jun;32(2-3):118-25.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. habil. Eberhard Straube, Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen, für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung.

Ebenso danke ich Herrn Dr. rer. nat. Matthias Hartmann für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Er stand mir stets mit sehr hilfreichem Rat zur Seite.

Auch Frau Rosemarie Seidel und Frau Bettina Meinung gilt mein bester Dank für die technische Unterstützung.

Lebenslauf

Burkhardt, Janosch Nicolas

geb. am 07. 12. 1973

in Pforzheim

ledig

08/1980 – 07/1984

Grundschule Vaihingen an der Enz

08/1984 – 05/1993

Friedrich-Abel-Gymnasium Vaihingen an der Enz

25. 05. 1993

Abitur

08/1993 – 07/1994

Ableistung des Zivildienstes im Op-Bereich und auf der anästhesiologischen Intensivstation des KKH Mühlacker

10/1994 – 09/1996

Vorklinische Ausbildung an der FSU Jena

17. 09. 1996

Ärztliche Vorprüfung

10/1996 – 09/1997

Erster Abschnitt der klinischen Ausbildung an der FSU Jena

28. 08. 1997

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/1997 – 09/1999

Zweiter Abschnitt der klinischen Ausbildung an der FSU Jena

23. 09. 1999

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/1999 – 03/2000

Wissenschaftliche Hilfskraft im Rahmen der Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena bei Herrn Prof. Straube.

04/2000 – 03/2001

Praktisches Jahr

1. Tertial Anästhesiologie/Intensivtherapie, Prof. Schirrmeister
Wald-Klinikum Gera.

2. Tertial Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Prof. Wahlers
FSU Jena

3. Tertial Innere Medizin, Prof. Fournier

Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens - Frankreich

13. 06. 2001

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 01. 07. 2001

Arzt im Praktikum in der Herz- Thorax- und Gefäßchirurgie der
Friedrich-Schiller-Universität Jena bei Herrn Prof. Wahlers

Jena, den 11. Juli 2002

Janosch Burkhardt

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. habil. Eberhard Straube, Herr Dr. rer. nat. Matthias Hartmann, Frau Rosemarie Seidel, Frau Bettina Meinung,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 11. Juli 2002

Janosch Burkhardt